



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**TESE**

**CARACTERIZAÇÃO MORCULTURAL, PATOGÊNICA E**  
**MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gossypii* E *Colletotrichum***  
*gossypii* var. *cephalosporioides*

**VANESSA CAVALCANTE DE ALMEIDA**

**2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CARACTERIZAÇÃO MORCULTURAL, PATOGÊNICA E MOLECULAR DE  
ISOLADOS DE *Colletotrichum gossypii* E *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides***

**VANESSA CAVALCANTE DE ALMEIDA**

*Sob orientação da Professora*  
**Luciana Cordeiro do Nascimento**

*e Co-orientação do Pesquisador*  
**Alderí Emídio de Araújo**

Tese defendida como requisito para  
obtenção do título de Doutor em  
Agronomia, no Programa de Pós-  
graduação em Agronomia.

Areia, PB  
Dezembro de 2013

A447c Almeida, Vanessa Cavalcante de.  
Caracterização morcultural, patogênica e molecular de  
isolados de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii*,  
var. *cephalosporioides* / Vanessa Cavalcante de Almeida.--  
Areia, 2013.  
73f. : il.  
Orientadora: Luciana Cordeiro do Nascimento  
Coorientador: Alderi Emidio de Araújo  
Tese (Doutorado) – UFPB/CCA  
1. Agronomia. 2. Algodoeiro. 3. Ramulose. 4. Antracnose.  
5. Marcadores de DNA.

UFPB/BC

CDU: 631(043)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO MORCULTURAL, PATOGÊNICA E MOLECULAR  
DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gossypii* E *Colletotrichum gossypii* var.  
*cephalosporioides***

**AUTOR: VANESSA CAVALCANTE DE ALMEIDA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR em AGRONOMIA  
pela comissão Examinadora:

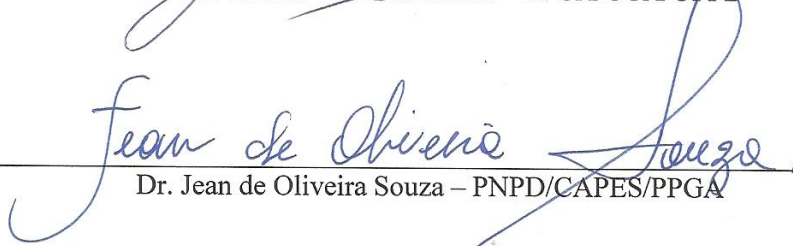


Profª. Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento – PPGA/CCA/UFPB  
Orientadora

Dr. Alderi Emídio de Araújo – EMBRAPA ALGODÃO



Prof. Dr. Jacinto de Luna Batista – PPGA/CCA/UFPB



Dr. Jean de Oliveira Souza – PNPd/CAPES/PPGA

Data da Realização: 19 de Dezembro de 2013.

Presidente da Comissão Examinadora  
Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento  
Orientadora

*À minha mãe Maria das Graças, ao meu pai Severino (em memória), por dedicarem parte de suas vidas, na minha formação pessoal e profissional, pelo amor a mim dedicado e por me proporcionarem paz na alma e felicidade na vida.*

*Aos meus irmãos Larissa e Fabiano e a minha avó Leopoldina, por todo amor e pelo companheirismo de toda vida.*

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, nosso pai, por ser a luz e a força maior que conduz os meus passos em todos os momentos da minha vida.

A minha mãe **Maria das Graças**, ao meu pai **Severino Almeida** (em memória), aos meus irmãos **Larissa Almeida** e **Fabiano Almeida** pelo apoio incondicional, amizade e carinho. E a minha avó **Leopoldina Erlinda** e primas **Camila Cavalcante** e **Amanda Cavalcante** por todos os momentos de felicidade e pela inestimável ajuda.

A **Washington Moraes** por estar sempre presente em todos os momentos. Que esteja para sempre...

A grande amiga **Iane Azevedo**, que mesmo quando longe, está sempre perto...

\*\*\*

A **Universidade Federal da Paraíba**, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

A Profª Dra. **Luciana Cordeiro do Nascimento**, pela confiança, orientação, ajuda, paciência e incentivo nos momentos mais difíceis.

Ao Dr. **Alderí Emídio de Araújo**, pela inestimável ajuda, força e apoio nessa jornada.

Ao Dr. **Gilvan Ferreira da Silva**, pela receptividade e oportunidade de ampliar meus horizontes.

A **Embrapa Algodão**, por mais uma oportunidade concedida, e pelo apoio prestado ao desenvolvimento da carreira científica.

A **Embrapa Amazônia Ocidental**, pela oportunidade de execução de parte do trabalho em suas instalações.

Aos **docentes** do Programa de Pós-graduação em Agronomia, pelos ensinamentos e contribuição para minha formação científica.

Aos colegas do curso, em especial a **Márcia Gondim** pela amizade e companheirismo.

Aos membros da banca Examinadora Prof. Dr. **Jacinto de Luna Batista** e Dr. **Jean de Oliveira Souza**, pela disponibilidade e contribuições.

Aos funcionários da Embrapa Algodão, em especial a **Fábia Sueli**, **Lane Fernandes** e **Juarez**, pela amizade e profissionalismo.

Aos colegas da Embrapa Amazônia Ocidental, em especial a **Ana Mara Oliveira** e **Thayanne Bastos**, pela receptividade, acolhimento e grande auxílio durante o desenvolvimento dos trabalhos.

A todos os meus **alunos**, pelo carinho, compreensão e apoio.

A todas as pessoas que não foram citadas, mas que fizeram parte da minha vida e história, parte do meu presente e que, de alguma forma, contribuíram para o meu futuro.

*A todos, o meu sincero agradecimento!*

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Grau de importância das principais doenças que infectam a cultura do algodoeiro no Brasil.....	19
--	----

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Quadro de análise de variância para as variáveis diâmetro da colônia, esporulação, comprimento e largura dos conídios de <i>Colletotrichum gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> .....	43
--	----

Tabela 2. Dimensões de conídios de <i>Colletotrichum gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> mensuradas por meio do comprimento e largura sob três diferentes temperaturas.....	44
---	----

Tabela 3. Efeito de diferentes temperaturas sobre o crescimento micelial de cinco isolados de <i>Colletotrichum gossypii</i> e cinco de <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> .....	45
--	----

Tabela 4. Efeito de diferentes temperaturas sobre a esporulação de cinco isolados de <i>Colletotrichum gossypii</i> e cinco de <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> .....	46
---	----

Tabela 5. Características culturais de seis isolados de <i>Colletotrichum gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> .....	48
---	----

Tabela 6. Reação das plantas de algodoeiro da variedade BRS Cedro inoculadas com <i>Colletotrichum gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> .....	50
--	----

### CAPÍTULO III

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nas análises com marcadores moleculares.....	63
---	----

Tabela 2. Características dos marcadores ERIC-PCR, ISSR, IRAP, REMAP e Box-PCR para <i>Colletotrichum gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> .....	66
---	----

Tabela 3. Estimativa de similaridades genéticas entre dez isolados de <i>Colletotrichum gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> , baseadas em dados de ERIC-PCR, ISSR, IRAP, REMAP e BOX-PCR, pelo coeficiente de Jacard.....	68
---	----



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

Figura 1. Placa dos isolados de <i>Colletotrichum</i> .....	49
---	----

### CAPÍTULO III

Figura 1. Perfil eletroforético do DNA de <i>Colletotrichum gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> gerado por ERIC-PCR.....	67
--	----

Figura 2. Dendrograma revelando a similaridade genética entre dez isolados de <i>Colletotrichum gossypii</i> (95, 109, 457-1, 457-2, 37) e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> (50, 67, 74, 86, 105), baseado no coeficiente de Jacard, usando o método UPGMA.....	69
---	----

## SUMÁRIO

RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	12
CAPÍTULO I.....	13
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1 O hospedeiro – Plantas de algodoeiro .....	16
2.1.2 Características, distribuição e diversidade do gênero <i>Gossypium</i> no Brasil .....	17
2.2 A Doença – Ramulose e antracnose do algodoeiro .....	19
2.2.1 Origem e distribuição .....	19
2.2.2 Impactos econômicos .....	20
2.2.3 Sintomas, epidemiologia e controle .....	21
2.3 O patógeno – <i>Colletotrichum gossypii</i> e <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> .....	23
2.3.1 O gênero <i>Colletotrichum</i> .....	23
2.3.2 Identificação de <i>Colletotrichum gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> .....	24
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27
CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> E <i>Colletotrichum gossypii</i> .....	36
RESUMO .....	37
ABSTRACT .....	38
1. INTRODUÇÃO .....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	41
2.2 Caracterização morfológica e cultural de isolados de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> .....	41
2.3 Caracterização patogênica dos isolados de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> ....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
4. CONCLUSÕES.....	53

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
Capítulo III - MARCADORES MOLECULARES PARA DIFERENCIAÇÃO DE <i>Colletotrichum</i>	
<i>gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> E <i>Colletotrichum gossypii</i> .....	58
RESUMO .....	59
ABSTRACT .....	60
1. INTRODUÇÃO .....	61
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	63
2.1 Obtenção dos isolados de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> .....	63
2.2 Extração de DNA .....	63
2.3 Condições de amplificação.....	64
2.4 Análise dos dados.....	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	67
4. CONCLUSÃO .....	71
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72

## RESUMO

ALMEIDA, Vanessa Cavalcante de. **Caracterização morfocultural, patogênica e molecular de isolados de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides***. 2013. 73f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba. Areia: 2013.

Considerando a importância da identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à cultura do algodoeiro, bem como a escassez de informações a respeito da sistemática das espécies, o objetivo desse trabalho foi a realização da caracterização morfológica e patogênica de isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e de *C. gossypii* submetidos a diferentes temperaturas, visando identificar possíveis diferenças entre as duas espécies e avaliação do uso de marcadores moleculares para diferenciação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Foram utilizados cinco isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e cinco isolados de *C. gossypii* os quais foram incubados a 20, 25 e 30 °C. Foram mensurados o crescimento micelial, a esporulação, a dimensão dos conídios assim como a topografia e coloração das colônias e o DNA desses isolados foi utilizado para análises com os marcadores moleculares ERIC-PCR, ISSR, IRAP, REMAP e Box-PCR. Os dados de caracterização cultural foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey. Os dados de patogenicidade foram analisados empregando-se o Modelo Linear Generalizado. Os resultados revelaram que houve diferenças entre os isolados em relação ao crescimento micelial e esporulação das duas espécies nas diferentes temperaturas, não tendo sido observada variação no comprimento e largura dos conídios. *C. gossypii* expressou sintomas de antracnose, enquanto sintomas de ramulose foram observados apenas em plantas inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. A combinação dos cinco marcadores analisados amplificou 54 locos, dos quais 48% foram polimórficos. O marcador mais informativo foi o ERIC-PCR. Os padrões de bandas de DNA foram empregados para cálculo dos valores de similaridade genética, os quais mostraram similaridade mínima de 55% e máxima de 100%. O dendograma apresentou dois grupos distintos, um grupo incluindo todos os isolados caracterizados como *C. gossypii* e o outro com agrupamento dos isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* indicando que as técnicas moleculares baseadas na combinação dos marcadores ERIC-PCR, ISSR, IRAP, REMAP e Box-PCR foram eficientes para diferenciar *C. gossypii* de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

**Palavras – chave:** Algodoeiro, Ramulose, Antracnose, Marcadores de DNA

## ABSTRACT

ALMEIDA. Vanessa Cavalcante de. **Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Colletotrichum gossypii***. 2013. 73f. Thesis (Ph.D. in Agronomy) - Centre for Agrarian Sciences, Federal University of Paraíba. Areia: 2013.

Considering the importance of identification of *Colletotrichum* species associated with cotton plants as well as the lack of information about the systematic species, the aim of this work was the realization of characterization morphological and pathogenic of isolates of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* and *C. gossypii* subjected to different temperatures, in order to identify possible differences between the two species and evaluate the use of molecular markers for the differentiation of *C. gossypii* and *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Five isolates of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* and five isolates of *C. gossypii* were incubated at 20, 25 and 30 °C. Were mensured the mycelial growth, sporulation, the size of conidia as well as topography and color of the colony and the DNA these isolates was used for analysis with molecular markers ERIC-PCR, ISSR, IRAP, REMAP and Box-PCR. Cultural characterization data were subjected to analysis of variance and compared by Tukey test. Pathogenicity data were analyzed employing the Generalized Linear Model. The results revealed that there were differences among the isolates in relation to mycelial growth and sporulation of the two species at different temperatures, no variation in the length and width of conidia was observed. *C. gossypii* expressed anthracnose symptoms, while symptoms ramulosis were observed only in plants inoculated with *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. The combination of the five markers amplified 54 loci, of which 48% were polymorphic. The most informative marker was ERIC-PCR. The patterns of DNA bands were used to calculate the values of genetic similarity, which showed minimal similarity of 55% and a maximum of 100%. The dendrogram showed two distinct groups, one including all isolates characterized as *C. gossypii* and the other group of isolates of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* indicating that molecular techniques based on the combination of markers ERIC-PCR, ISSR, IRAP, REMAP and Box-PCR were efficient to differentiate *C. gossypii* of *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

**Keywords:** Cotton, Ramulosis, Anthracnose, DNA markers

## **Capítulo I**

### **INTRODUÇÃO GERAL**

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos maiores produtores de algodoeiro (*Gossypium* spp.) do mundo, ocupando o quinto lugar, estando atrás apenas da China, Índia, Estados Unidos e Paquistão, tendo produzido na safra 2012/2013 mais de três milhões de toneladas de algodão em caroço e mais de um milhão de toneladas de pluma (CONAB, 2013).

Como áreas produtoras de algodoeiro no país destacam-se as regiões Centro-Oeste e Nordeste. A produção concentra-se nos estados de Mato Grosso, Bahia, Goiás e Mato Grosso do Sul), que juntas são responsáveis por aproximadamente 96% da produção nacional do algodão herbáceo.

O crescimento da produção algodoeira no cerrado deu-se a partir do início da década de 1990, como alternativa para a sucessão com a cultura da soja, encontrando naquela região, condições propícias para o seu desenvolvimento, principalmente, a partir do lançamento de cultivares com maior rendimento de fibra, adaptadas àquele ecossistema e com adoção de alto nível de tecnologia e insumos em todo o sistema de produção (PAIVA et al., 2001). Tais procedimentos têm possibilitado a viabilidade econômica da cultura e elevado os rendimentos obtidos nos últimos anos. Entretanto, é preocupante o aumento sistemático no uso de insumos, destacando-se, os fungicidas (SUASSUNA; COUTINHO, 2007; ARAÚJO, 2008).

Quanto aos problemas fitossanitários no algodoeiro, encontram-se mais de 250 espécies de fitopatógenos que acometem a cultura, das quais 90% são fungos. Muitos destes patógenos não apresentam qualquer importância econômica, porém, outros são altamente destrutivos destacando-se os causadores da ramulose, do mosaico das nervuras, da mancha angular, das manchas foliares, da podridão das maçãs, entre outros (CIA; FUZATTO, 1999).

Não existem dados oficiais sobre os efeitos somados de todas as doenças sobre a produção de algodoeiro. Entretanto, como muitos patógenos da cultura ocorrem nas regiões produtoras (CIA; SALGADO, 1995), estima-se que as perdas sejam substanciais. Depois que grandes áreas produtoras de algodoeiro se instalaram em regiões de Cerrado, tem sido constatada alta incidência de doenças foliares, inclusive aquelas que eram consideradas de pouca importância para a cultura nas regiões tradicionalmente produtoras (MONTEIRO, 2007). Cia e Fuzatto (1999), classificando a importância potencial de doenças do algodoeiro, até o ano de 1999, em estados produtores da região do Cerrado brasileiro, identificaram a ramulose e a mancha angular como as de maior importância dentre as doenças fúngicas e bacterianas, respectivamente.

A ramulose é causada por uma variedade fisiológica do agente causal da antracnose (*Colletotrichum gossypii*), que recebeu o nome de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (CIA; SALGADO, 1995). Essa doença foi diagnosticada pela primeira vez no município de Rancharia – SP, em 1936 e já se encontra disseminada praticamente por todas as regiões do país onde se cultiva o algodão (KIMATI et al., 1997). Fora do Brasil, sua ocorrência foi relatada somente na Venezuela (MALAGUTI, 1955) e no Paraguai (MATHIESON; MANGANO, 1985). No Brasil, antracnose e ramulose parecem ser causadas por dois patógenos diferentes que pertencem ao complexo *C. gloeosporioides* (BAILEY et al., 1996; SILVA-MANN et al., 2005; WEIR et al., 2012).

Os dois patógenos, que causam a ramulose e antracnose, são transmitidos via semente e são morfológicamente muito semelhantes. A diferenciação de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* de *C. gossypii* que se desenvolvem sobre as sementes de algodoeiro, é muito difícil quando se utilizam métodos rotineiros de patologia de sementes como incubação em papel de filtro, plaqueamento em ágar e outros, comprometendo a confiabilidade dos métodos usuais disponíveis.

A utilização de técnicas moleculares pode ser bastante promissora para solucionar os problemas metodológicos na detecção e diferenciação de patógenos em sementes. Tais técnicas têm sido utilizadas para estudar a filogenia, a variabilidade genética e a detecção de fungos fitopatogênicos (ZANOTTA, 2013) e têm sido desenvolvido estudos baseados na utilização de marcadores de DNA para caracterizar sistematicamente relações de espécies de *Colletotrichum* e para servir como uma base para o diagnóstico de espécies (CROUCH et al., 2006, 2009b; FARR et al., 2006; DAMM et al., 2009; PRIHASTUTI et al., 2009).

Neste estudo, objetivou-se a realização da caracterização morfológica e patogênica de isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e de *C. gossypii* submetidos a diferentes temperaturas, visando identificar possíveis diferenças entre as duas espécies; e avaliação do uso de marcadores moleculares para diferenciação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.



## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 O hospedeiro – Plantas de algodoeiro**

#### **2.1.1 Importância sócio-econômica da cultura do algodoeiro**

O algodoeiro é considerado a mais importante das fibras têxteis, naturais ou artificiais, sendo a planta de aproveitamento mais completo e que oferece os mais variados produtos. Sua utilização concentra-se na indústria de fiação e tecelagem e na indústria de alimentação animal (farelo) e humano (óleo), sendo de amplo número de produtos secundários, apresentando grande importância socioeconômica (ANUÁRIO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 2013).

Está entre as mais importantes culturas de fibras no mundo. Todos os anos, uma média de 35 milhões de hectares de algodão é plantada por todo o planeta. A demanda mundial tem aumentado gradativamente desde a década de 1950, com um crescimento anual médio de 2%. O comércio mundial do algodão movimenta anualmente cerca de US\$ 12 bilhões e envolve mais de 350 milhões de pessoas em sua produção, desde as fazendas até a logística, o descaroçamento, o processamento e a embalagem (ABRAPA, 2013).

A produção nacional de algodão em caroço para a safra 2012/13 está estimada em 3.291,6 mil toneladas, configurando, portanto, uma redução de 33,3% em comparação à safra 2011/12. A produção do algodão em pluma por sua vez, será de 1.275,1 mil toneladas, registrando redução de 32,7%, comparativamente à safra anterior (CONAB, 2013). Tais retrações devem-se, principalmente, às expressivas reduções de áreas em todas as regiões produtoras do país, ocasionada, sobretudo, pela retração dos preços nos mercados interno e externo, os altos custos de produção, e os atraentes preços do milho (*Zea mays*) e da soja (*Glycine max*), e em decorrência de uma praga que ainda não havia sido identificada no Brasil, *Helicoverpa armigera*, que destruiu lavouras na Bahia (o segundo maior produtor do país), no Piauí, no Maranhão, em Mato Grosso, em Goiás, no Paraná, em São Paulo e em Minas Gerais (ABRAPA, 2013).

Mas nada disso representa queda na importância da fibra no mercado mundial. O período 2012/13 reflete apenas a situação de momento com preços baixos e demanda menor, principalmente por parte da China, maior compradora de algodão no mundo, que formou

estoques estimados em 6 milhões de toneladas na última safra. Espera-se que para o ciclo 2013/14 a área plantada com a cultura no Brasil cresça cerca de 25% em relação à safra 2012/13, e uma produção 30% maior do que a atual (ANUÁRIO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 2013).

### **2.1.2 Características, distribuição e diversidade do gênero *Gossypium* no Brasil**

O algodoeiro é uma planta ereta, anual ou perene, dotada de raiz principal cônica, pivotante, profunda, e com pequeno número de raízes secundárias grossas e superficiais. O caule herbáceo ou lenhoso tem altura variável e é dotado de ramos vegetativos (4 a 5 intraxilares, na parte inferior), e ramos frutíferos (extraxilares, na parte superior). As folhas são pecioladas, geralmente cordiformes, de consistência coriácea ou não e inteiras ou recortadas (3 a 9 lóbulos) (SALVATIERRA et al., 2009)

O Brasil é um dos detentores da maior variabilidade existente em espécies de algodoeiro tetraplóides (VILARINHO, 2006), apresentando três espécies: *G. hirsutum*, *G. barbadense* e *G. mustelinum*.

A espécie *G. hirsutum* está representada por duas raças exóticas, *G. hirsutum* raça *latifolium* Hutch e *G. hirsutum* r. *marie galante*. A primeira é denominada algodoeiro herbáceo, nativa do México e introduzida via Estados Unidos (WENDEL e CRONN, 2003), amplamente cultivada no Brasil e no mundo, apresenta grande capacidade adaptativa a diferentes ambientes (SALVATIERRA et al., 2009). Trata-se de uma planta de grande complexidade morfológica, possuindo particularidades importantes que são utilizadas na identificação da espécie dentro do gênero *Gossypium* e da família Malvaceae. A segunda raça é conhecida como algodoeiro mocó sendo encontrada apenas no semi-árido da região Nordeste do país, na forma de variedades cultivadas, populações ferais e de fundo de quintais (PERCY et al., 2006). Originária das Antilhas e trazida para o Brasil provavelmente por holandeses e africanos, durante o período colonial, foi cultivada no semi-árido do Nordeste até a década de 80 (PINTO DE MENEZES, et al., 2010).

A espécie *G. barbadense* é nativa do norte do Peru e amplamente distribuída no Brasil (BRUBAKER et al., 1999; BARROSO e FREIRE, 2003). Dois tipos desta espécie de algodoeiro são encontrados no Brasil. O primeiro corresponde a cultivares introduzidas,

principalmente dos Estados Unidos e de Israel, para a produção de fibra extra-longa. A área cultivada é pequena, ocupando menos de 0,5% da área de algodão no país. O outro tipo é representado por genótipos tradicionais que não sofreram qualquer tipo de melhoramento convencional e são descendentes de plantas cultivadas pela população local, antes da colonização européia (NEVES et al., 1968; FREIRE, 2000). A espécie *G. barbadense* pode ser encontrado ao longo de quase todo o território brasileiro e, apesar de não ser nativo do Brasil, o país é considerado um importante centro secundário de diversidade de algodoeiro (ALMEIDA et al., 2009).

Os tipos tradicionais de *G. barbadense* pertencem a duas raças botânicas, ambas apresentam-se como formas semi-domesticados (FREIRE, 2000). A raça *brasiliense* foi domesticada na Bacia Amazônica. Sementes de cada lóculo aderem-se uns aos outros, formando uma estrutura conhecida como rim-de-boi. Brubaker et al. (1999) consideram mais apropriado classificar a raça *brasiliense* como uma forma local domesticada. A outra raça (*barbadense*) apresenta sementes não agregadas e é popularmente conhecido como "quebradinho". Ambas as raças crescem como arbustos e são perenes (FREIRE, 2000; ALMEIDA et al., 2009). A espécie *G. barbadense* foi amplamente cultivada no Brasil, durante o período colonial para abastecer a indústria de fiação local, bem como para a exportação para a Europa. Seu uso como planta de fibra diminuiu após o algodoeiro herbáceo (*G. hirsutum* var. *latifolium*) e Mocó (*G. hirsutum* var. *Marie-galante*) serem introduzidos (NEVES et al., 1968).

A única espécie nativa do Brasil é *G. mustelinum*, que apresenta distribuição restrita ao semi-árido Nordeste, na forma de populações silvestres, dispostas ao longo das margens e rios temporários (FREITAS, et al., 2008; ALVES, et al., 2013). O principal problema para a manutenção *in situ* de *G. mustelinum* é a prática da pecuária extensiva, particularmente de caprinos. Os animais se alimentam de brotos, folhas, frutos, sementes e da casca do caule, prejudicando o desenvolvimento e, em alguns casos, provocando a morte das plantas adultas. Além disso, a renovação das plantas também é comprometida, uma vez que o pastejo em indivíduos jovens ocasiona sua completa destruição (ALVES et al., 2013).

O conhecimento relacionado à diversidade genética das espécies pode proporcionar vantagens aos programas de melhoramento, pois a introdução de variabilidade pode reduzir a vulnerabilidade a pragas e a doenças. Além da grande variabilidade, as espécies de algodoeiro encontradas no Brasil apresentam simpatria e podem trocar material genético entre si gerando descendentes férteis, favorecendo com isso a ampliação da heterogeneidade e o surgimento de novas combinações alélicas. Muitas variedades de algodoeiro têm sido desenvolvidas a partir

desses materiais, entretanto, o ganho de produtividade limitada tem levado ao uso mais extensivo de germoplasma até então não utilizado (SILVA, 2012).

## **2.2 A Doença – Ramulose e Antracnose do Algodoeiro**

### **2.2.1 Origem e distribuição**

O patógeno *Colletotrichum gossypii* South., agente causador da antracnose, foi observado em áreas produtoras de algodoeiro atacando todas as partes da planta, e com maior frequência causando doenças em frutos (maçã) na América do Norte. Em 1891, Atkinson, ao investigar outras doenças no algodoeiro, encontrou o mesmo fungo na superfície de folhas sintomáticas, com o inóculo se espalhando rapidamente pelo campo de cultivo. Por fim, descreveu-se o teleomorfo *Glomerella gossypii*, isolado a partir de maçãs de algodoeiro que apresentavam peritécios e que foram coletadas no estado da Louisiana, EUA (EDGERTON, 1909).

No ano de 1936, uma doença foi observada ocorrendo em cultivos de algodoeiro no estado de São Paulo, que foi identificada, erroneamente, como “crumpling disease”. Após o conhecimento da ocorrência de uma doença que ainda não havia sido relatada no estado, pesquisadores do Instituto Agrônomo de Campinas a identificaram e a descreveram nomeando a doença como “superbrotamento ou ramulose do algodoeiro”, porém não foi possível identificar seu agente causal (COSTA; FRAGA JR., 1937). Somente em 1939, o agente causal da ramulose foi descrito no Brasil como sendo o patógeno *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, por apresentar caracteres morfológicos muito semelhantes a *C. gossypii* South (COSTA; FRAGA JR., 1939).

A ramulose encontra-se disseminada em quase todos os estados do Brasil onde se cultiva o algodoeiro (SUASSUNA, 2005). Além de São Paulo e Paraná, também foi diagnosticada nos estados de Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Pará, Bahia, Goiás (CIA, 1997), Ceará (ARAÚJO et al., 1978), Mato Grosso do Sul (CIA; SALGADO, 1997) e em Minas Gerais (GAEIRAS, 1978). Segundo Barrocas (2008) na região Centro-Oeste sua incidência continua aumentando ao longo dos anos.

Na Venezuela, a doença é conhecida por “witches’ broom”, devido a semelhança dos sintomas com aqueles característicos da vassoura-de-bruxa do cacaueiro causada pelo fungo

*Crinipellis pernicioso* e pela aparência de vassoura, induzida às plantas infectadas pela emissão de ramificações excessivas (MALAGUTI, 1955; SUASSUNA, 2005).

### 2.2.2 Impactos econômicos

Diversos problemas de ordem fitossanitária têm afetado a cultura do algodoeiro no Brasil (CHIAVEGATO, 2001). De uma maneira geral, o algodoeiro é uma planta hospedeira de mais de 250 agentes patogênicos, já descritos na literatura. Dentre eles destacam-se os fungos, vírus, bactérias e nematóides (SALVATIERRA, 2009). Na Tabela 1 encontra-se o grau de importância das principais doenças que infectam o algodoeiro. Dentre elas observa-se que Ramulose, Mosaico das nervuras, Mancha angular e Manchas foliares são consideradas as mais importantes.

**Tabela 1.** Grau de importância das principais doenças que infectam a cultura do algodoeiro no Brasil

Doenças	Sul/Sudeste			Centro-Oeste			Norte		Nordeste	Total
	PR	SP	MG	GO	MS	MT	RO	PA	Outros	
Murcha do Fusarium	4	5	3	3	2	1	-	-	-	18
Murcha do Verticilium	3	3	1	1	1	1	-	-	X	10
Ramulose	3	3	4	5	4	5	5	5	X	34
Mancha angular	4	3	3	3	3	3	3	3	X	25
Manchas foliares	3	2	2	3	3	4	3	3	X	24
Mosaico das Nervuras	4	5	5	5	5	5	X	X	X	29
Viroses	-	X	X	X	X	X	-	-	X	-
Murchamento avermelhado	4	5	3	3	3	3	-	-	-	21
Nematóides	4	5	4	3	3	2	-	-	-	21
Podridão das Maças	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-
Mofo branco	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-

Escala de notas: 1 = sem importância; 2 = pequena importância; 3 = medianamente importante, necessitando precauções e estudos; 4 = importante, demandando medidas de controle; 5 = muito importante, inviabilizando a cultura se não houver controle; X = presença detectada; - = presença não detectada. Fonte: SALVATIERRA, 2009.

Os danos à cultura do algodoeiro causados pela ramulose podem atingir entre 30 e 70% no rendimento, podendo chegar a até 85% quando as condições de ambiente são favoráveis (SUASSUNA, 2005). Esses prejuízos estão diretamente relacionados com a suscetibilidade da cultivar, da idade da planta afetada e das condições climáticas (FREIRE et al., 1997). Se houver distribuição generalizada da doença no campo, as perdas podem ser totais (SUASSUNA, 2005).

Embora sejam conhecidos os efeitos danosos da ramulose do algodoeiro, não existem estudos que revelem a quantificação dos danos a produção de pluma, em função da intensidade da ramulose sob as condições de plantio no cerrado (ARAÚJO, 2008).

### **2.2.3 Sintomas, epidemiologia e controle**

Em algodoeiro, *C. gossypii* var. *cephalosporioides* infecta as folhas, os pecíolos e o colmo provocando nanismo e superbrotamento dos ramos o que prejudica a formação de maçãs e, conseqüentemente, o rendimento da cultura (MEHTA et al., 2005). Em condições ideais esta doença pode causar perdas na produção de até 60% (FREIRE, 2007).

O início da infecção é caracterizado pela ocorrência de manchas necróticas circulares nas folhas jovens com reentrâncias e de aspecto estrelado, cujo centro normalmente se torna quebradiço quando se localizam no pecíolo e nas nervuras (enrugamento da superfície foliar). A necrose do meristema apical estimula o desenvolvimento de brotos laterais, para onde é direcionada a produção de assimilados da planta, levando ao superbrotamento e aspecto envassourado, além de pequeno porte e redução do número de capulhos (CIA; SALGADO, 1997).

Quando a doença afeta plantas novas, as gemas terminais dos ramos extranumerários podem sofrer novas infecções e, pela sua morte, estimulam o desenvolvimento de novas gemas. Isso poderá carrear de energias para o crescimento vegetativo em resposta a sucessiva destruição das gemas apicais que exaure a planta prejudicando a frutificação. Plantas doentes podem ser facilmente distinguidas das sadias, pois estas derrubam as folhas e apresentam grande número de capulhos. Ao passo que as plantas doentes, apresentam densa massa de folhagem escura e poucos capulhos. Normalmente observam-se na parte inferior da planta com muitos sintomas algumas folhas mais desenvolvidas, de coloração verde mais escuro e aspecto coriáceo ou quebradiço (CIA; SALGADO, 1995).

As condições favoráveis ao desenvolvimento do fungo são alta pluviosidade e boa fertilidade do solo. Segundo Arndt (1944) a temperatura ótima para a infecção em campo encontra-se ao redor de 22 °C, sendo que temperaturas abaixo de 18 °C e acima de 36 °C são limitantes. A temperatura ótima para o crescimento e desenvolvimento do fungo *in vitro* está entre 25 e 30 °C (CIA; SALGADO, 1997).

A ramulose apresenta como principal modo de disseminação as sementes, mas, outra via de disseminação é pelo solo contaminado. Por qualquer uma delas, o inóculo primário, encontrando ambiente favorável e hospedeiro suscetível estabelece focos iniciais de infecção. Estes, com o progresso da doença, darão origem a focos secundários que podem levar geralmente a um quadro epidemiológico (TALAMINI; STADNIK, 2004).

A antracnose que afeta a cultura do algodoeiro tem como agente causal o fungo *C. gossypii*. Seus sintomas são apodrecimento nos frutos, conhecidos por maçãs e tombamento de plântulas (SOUTHWORTH, 1890). O patógeno *C. gossypii* pode ocorrer em qualquer parte do algodoeiro, podendo ser altamente prejudicial para os frutos. As plântulas de algodão quando infectadas, apresentam lesões deprimidas nas raízes e no colo e tem coloração pardo-avermelhadas a pardo-escuras, o que resulta em tombamento. *C. gossypii* pode viver saprofitamente, entretanto são as sementes infectadas que constituem a principal fonte do inóculo (CIA; SALGADO, 1997).

As medidas recomendadas para o controle da ramulose e antracnose são a utilização de cultivares resistentes (CARVALHO et al., 1984; CIA; SALGADO, 1997), sementes livres de patógenos (MENTEN, 1986; MACHADO, 1988; CIA; SALGADO, 1997); tratamento das sementes infectadas com fungicidas (PAIVA et al., 2001), rotação de culturas, além de outras medidas que funcionam preventivamente, como inspeção periódica do campo para erradicação de plantas doentes e a pulverização de plantas sadias adjacentes às plantas doentes. Dentre essas medidas têm sido a utilização de sementes livres de patógenos.

## 2.3 O Patógeno – *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*

### 2.3.1 O gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* descrito por Corda em 1837 compreende várias espécies incluindo saprófitas e fitopatogênicas, sendo estas responsáveis pela doença denominada antracnose em várias plantas hospedeiras, causando enormes prejuízos (VON ARX, 1957; MENEZES, 2006)

Segundo Von Arx. (1957), foi Stoneman que, em 1898, encontrou a forma ascogênica em antracnose provocada por espécies de *Gloerosporium*, e as colocou em um novo gênero, ao qual chamou de *Gnomoniopsis*. Porém, esse nome já havia sido ocupado com outro fungo por Belese em 1892. Então, em 1903, Von Schrenk e Spaulding mudaram a classificação para *Glomerella*, contendo cinco espécies.

Sutton (1992) organizou o gênero, incluindo as espécies do gênero *Colletotrichum* no gênero *Vermicularia*. Mais tarde o gênero foi reorganizado sob vários nomes, sendo os mais comumente empregados: *Dicladium*, *Ellisieola*, *Vermicularia*, *Colletotrichum* e *Gloerosporium*. Esses e outros nomes foram usados de maneira desordenada durante o séculos XIX e XX para várias espécies que hoje se encontram incluídas no gênero *Colletotrichum* (PEREIRA, 2009).

As espécies de *Colletotrichum* apresentam uma ampla distribuição geográfica, particularmente em ambientes quentes e úmidos dos trópicos. Os membros patogênicos de *Colletotrichum* ocorrem em diversas espécies de hospedeiros, desde culturas agrícolas e plantas medicinais, aos arbustos e árvores silvestres, causando podridões em colmos, caules e frutos, seca de ponteiros, manchas foliares, infecções latentes e antracnoses. As antracnoses são conhecidas como lesões necróticas profundas e delimitadas nos tecidos (MENEZES, 2002). Causam prejuízos variáveis, dependendo das condições ambientais favoráveis e do grau de suscetibilidade da planta em diferentes regiões produtoras no Brasil e no mundo.



### 2.3.2 Identificação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

A identificação de espécies de *Colletotrichum* têm encontrado dificuldades relacionadas à grande diversidade fenotípica dos isolados fúngicos, influencia dos fatores ambientais na estabilidade dos caracteres morfológicos e culturais, existência de formas intermediárias de morfologia das colônias e falta de padronização de condições culturais empregadas nos diferentes estudos (LÓPEZ, 2001; BONETT et al., 2010).

A determinação precisa da etiologia das doenças causadas por diferentes espécies de *Colletotrichum* é essencial para entender a epidemiologia desses patógenos e a correta identificação desses agentes é fundamental para decisões de quarentena, no melhoramento de plantas e para o controle da doença (CAI et al., 2009).

Em 1992, Ottonello estudou as características culturais, patogênicas e sorológicas de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, sugerindo a nomenclatura raça 1 para os isolados não associados à morte de ápices e raça 2 para isolados associados ao sintoma de superbrotamento, ou seja, os causadores de ramulose. Entretanto, isso não pode ser adotado uma vez que não existem cultivares definidos para a diferenciação de raças e nem trabalhos moleculares que sugiram essa diferença.

A diagnose com base no hábito de crescimento em sementes de algodoeiro nem sempre satisfaz os critérios recomendados por Tanaka et al. (1996) e Chitarra (1996), que encontraram resultados variáveis quanto à distinção de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Com a ineficiência dos métodos tradicionais, técnicas utilizando marcadores de DNA e bioquímicos tem demonstrado sucesso na identificação de espécies fúngicas.

Carvalho et al. (1997) para diferenciar os fungos *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, realizaram análises de isoenzimas de isolados em cultura pura dos dois fungos. Dentre os cinco sistemas enzimáticos testados, os perfis de esterase, fosfatase ácida e peroxidase permitiram distinguir os isolados *C. gossypii* de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Já Silva-Mann et al. (2002) não conseguiram fazer distinção entre isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* a partir de análises isoenzimáticas de esterase, fosfatase ácida e peroxidase.

Sutton (1992) ao comparar *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii* com *C. gloeosporioides* molecularmente, afirmou que estes apresentam grande similaridade entre si. Bailey et al. (1996) analisaram sequências de nucleotídeos do DNAr de várias espécies de *Colletotrichum* que infectam plantas da família Malvacea, e verificaram que isolados obtidos

de algodão (*C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*) são muito similares entre si e entre diversas formas de *C. gloeosporioides*. Os autores concluíram que não é apropriado considerar *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* como espécies distintas de *C. gloeosporioides* e propuseram que *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* fossem considerados como *formae speciales* de *C. gloeosporioides*, propondo a nomenclatura de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *gossypium*. Entretanto, Suassuna (2005) considerou a proposta inadequada, pois não permite distinguir entre o agente causal da ramulose e da antracnose do algodoeiro.

Mehta et al. (2001), utilizando técnica molecular de Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) e Repetitive Extragenic Palindromic elements (REP-PCR), não conseguiram distinguir os isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. O mesmo aconteceu com Carvalho (2005) com base em estudos das regiões ITS1, ITS2 e 5,8S do DNA ribossomal. Já Silva-Mann et al. (2005) estudaram a variabilidade genética entre isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* utilizando a técnica de AFLP (Amplified fragment length polymorphism) e indicaram a potencialidade desse método para a distinção entre as variedades.

A região ITS tem sido a mais utilizada para as análises moleculares do gênero *Colletotrichum*, porém existem preocupações quanto a sua utilização, devido à baixa resolução que o gene tem oferecido para a diferenciação das espécies (CAI et al., 2009). Isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* não foram separados em dois grupos distintos com a aplicação de algumas técnicas moleculares baseadas na região ITS (MEHTA; MEHTA, 2010).

Na tentativa de identificar diferenças entre *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* para desenvolver um método eficiente na detecção e identificação de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro utilizando a técnica PCR, Zanotta (2013) observou diferenças significativas nas sequências dos produtos de amplificação para o gene da beta-tubulina.

Rondon (2013) verificou sequências das regiões ITS rDNA, TUB2 e GAPDH para testar a hipótese de que a ramulose e antracnose do algodoeiro são causadas por patógenos distintos pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* e observaram que os isolados analisados formaram duas linhagens filogenéticas distintas dentro do clado delimitado recentemente *C. theobromicola*.

Tem-se empregado a filogenia baseada na utilização de multi-gene para caracterizar sistematicamente relações de espécies de *Colletotrichum* e para servir como uma base para o

diagnóstico de espécies (CROUCH et al., 2006 , 2009b; FARR et al., 2006; DAMM et al., 2009; PRIHASTUTI et al., 2009). Prihastuti et al. (2009) utilizaram seis genes: a região ITS do rDNA, Actina (ACT),  $\beta$ -tubulina (tub2), calmodulina (CAL), glutamina sintetase (GS) e Glyceraldehyde 3-fosfato desidrogenase (GPDH) para estudar algumas espécies de *Colletotrichum* intimamente relacionada (*C. gloeosporioides*) e concluíram que as relações entre as espécies podem ser bem resolvidas. Filogenias multi-genes foram também aplicadas com sucesso para resolver as relações de parentesco entre as espécies de *Colletotrichum* com conídios curvados de gramíneas e outras plantas herbáceas (CROUCH et al., 2009b; DAMM et al., 2009).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAPA. Associação Brasileira dos produtores de Algodão. **Exportações e importações Brasileiras, relatório agosto, 2013**. Brasília, DF, 2010, 12p.

ALMEIDA, V. C.; HOFFMANN, L. V.; YOKOMIZO, G. K.; COSTA, J. N.; GIBAND, M.; BARROSO, P. A. V. In situ and genetic characterization of *Gossypium barbadense* populations from the states of Pará and Amapá, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 719-725, 2009.

ALVES, M. F.; BARROSO, P. A. V.; CIAMPY, A. Y.; HOFFMANN, L. V.; AZEVEDO, V. C. R.; CAVALCANTE, U. Diversity and genetic structure among subpopulations of *Gossypium mustelinum* (Malvaceae). **Genetics and Molecular Research**, n.12, v.1, p.597-609, 2013.

**ANUÁRIO BRASILEIRO DO ALGODÃO - 2013**. Editora Gazeta Santa Cruz: Santa Cruz do Sul, 140 p., 2013.

ARAÚJO, A. E. de. **Deteção e transmissão planta-semente de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* Costa: efeito de níveis de incidência na semente e do controle químico da parte aérea sobre o progresso da ramulose do algodoeiro**. 2008. 94p. Tese (Doutorado em Agronomia) – ESALQ, Piracicaba, 2008.

ARAÚJO F. E.; CAVALCANTE, R. D.; CAVALCANTE, M. L. S. Ocorrência de ramulose em algodoeiro herbáceo no Ceará. **Fitossanidade**, n. 2, p. 89, 1978.

ARNDT, C. H. Infection of cotton seedlings by *Colletotrichum gossypii* as affected by temperature. **Phytopathology**, Saint Paul, v.34, p. 861-869, 1944.

ARX, J. A. Von. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Corda. **Phytopathologisch Zeitschrift**. Berlin, v. 29, n. 4, p. 413-468, 1957.

BAILEY, J. A.; NASH, C.; MORGAN, L. W.; O'CONNELL, K.; TEBEEST, D. O. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. **Phytopathology**, v. 86, p. 1076-1083, 1996.

BARROCAS, E. N. **Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de *Stenocarpella* sp. Em sementes de milho inoculadas.** 2008. 110p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2008.

BARROSO, P. A. V.; FREIRE, E. C. Fluxo gênico em algodão no Brasil. In: PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G.; SUJII, E. R. (Ed.). **Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas: o algodão resistente a insetos como estudo de caso.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: CNPq, p. 163-193, 2003.

BONETT, L. P.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, R. G. A.; AQUINO, T. F. de. BERNARDI-WENZELS, J. Caracterização morfo cultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 6, n. 3, 2010.

BRUBAKER, C. L.; BOURLAND, F. M.; WENDEL, J. F. The origin and domestication of cotton. In: SMITH, C. W.; COTHEN, J. T. (Ed.). **Cotton: origin, history, technology and production.** New York: John Wiley & Sons, p. 23-32, 1999.

CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Indonesia, v. 39, n. 1, p. 183–204, 2009.

CARVALHO, D.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Uso de isoenzimas para diferenciação de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* isolados de sementes de algodão. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 19, n. 2, p. 315-319, 1997.

CARVALHO, E. **Relações entre *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro: efeito de inibidores da germinação em testes de sanidade e a caracterização morfológica do patógeno.** 2005. 105p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

CARVALHO, L. P.; CAVALCANTI, F. B.; LIMA, E. F.; SANTOS, E. O. Influência da ramulose nas características de fibras e produção de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, p. 593-598, 1984.

CHIAVEGATO, E. J. Importância potencial de doenças do algodoeiro nas regiões produtoras do Brasil. In: Congresso Brasileiro do Algodão, 3, 2001, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Embrapa Algodão, p. 215-218, 2001.

CHITARRA, G. S. **Variabilidade cultural de *Colletotrichum* associado a sementes de algodão e sua diversidade genética através de marcadores RAPD sob condições padrões do teste de sanidade.** 1996. 56 p. (Dissertação – Mestrado) - UFLA, Lavras, 1996.

CIA, E.; FUZATTO, M. G. Manejo de doenças na cultura do algodão. In: CIA, E.; FREIRE, E. C.; SANTOS, W. J. (Ed.) **Cultura do algodoeiro.** Piracicaba: Potafós, 1999, p. 121-131.

CIA, E. Ocorrência e reconhecimento das doenças de algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.3, p. 167-193, 1997.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia.** São Paulo: Agronômica Ceres, vol. 2: Doenças das plantas cultivadas, p. 331-341, 1995.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: Kimati (Ed.) **Manual de Fitopatologia**, p. 33-48, 1997.

**CONAB. 2013.** (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2012/13 – décimo primeiro levantamento – agosto/2013. Companhia Nacional de Abastecimento – Brasília: CONAB, 2013.

COSTA, A. S.; FRAGA JR, C. G. Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 12, p. 249-259, 1937.

COSTA, A. S.; FRAGA JR, C. G. Sobre a natureza da “ramulose” ou “superbrotamento” do algodoeiro. **Jornal de Agronomia**, v. 2, p. 151-160, 1939.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B. B.; HILLMAN, B. I. Unraveling evolutionary relationships among the divergent lineages of *Colletotrichum* causing anthracnose disease in turfgrass and corn. **Phytopathology**, v. 96, p. 46-60, 2006.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B. B.; WHITE, J. F.; HILLMAN, B. I. Systematic analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species of the fungus from warm season grasses. **Mycologia**, v. 101, p. 717-732, 2009b.

DAMM, U.; WOUDEBERG, J. H. C.; CANNON, P. F.; CROUS, P. W. (2009). *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 45-87, 2009.

EDGERTON, C. W. The perfect stage of cotton anthracnose. **Mycologia**, Lawrence, v.1, n.3, p.115-120, 1909.

FARR, D. F.; AIME, M. C.; ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E. Species of *Colletotrichum* on *Agavaceae*. **Mycological Research**, v. 110, p. 1395-1408, 2006.

FREIRE, E. C. **Algodão no cerrado do Brasil**. Brasília: ABRAPA, p. 456-478, 2007.

FREIRE, E. C.; ANDRADE, F. P.; SANTANA, J. C. F. Cultivar derivada de híbrido de mocó x herbáceo – EMBRAPA 113 – Algodão 7MH. In: Congresso Brasileiro do Algodão, I, 1997, Fortaleza. **Anais...** Campina Grande: Embrapa-CNPA, p. 414-417, 1997.

FREIRE, E. C. **Distribuição, coleta, uso e preservação das espécies silvestres de algodão no Brasil**. Campina Grande: Embrapa-CNPA, 2000. 22p. (Embrapa-CNPA. Documentos, 78).

FREITAS, R. B.; SILVA, U. C.; ALVES, M. F.; CIAMPI, A. Y.; HOFFMANN, L. V.; BARROSO, P. A. V. Diversidade genética de populações de *Gossypium mustelinum* MIERS e estratégia para a conservação *in situ*. In: **Anais...** II Simpósio Brasileiro de Recursos Genéticos. Brasília, DF, p. 196, 2008.

GAEIRAS, L. A. Doenças do algodoeiro. **Informe Agropecuário**, v. 41, p. 44-47, 1978.

HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; OODWIN, P. H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P. R.; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 147-183, 2009.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**: vol. 2: doenças de plantas cultivadas. São Paulo: Ceres, p. 690-719, 1997.

LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S.; VIEIRA, R. M. Principais doenças do algodoeiro e seu controle. In: BELTRÃO, N. E. M. (Ed.) **O Agronegócio do Algodão no Brasil**. Brasília. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. p. 717-752, 1999.

LÓPEZ, A. M. Q. 2001. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. In: LUZ, W.C. (Ed). **Revisão Anual de Patologia de Plantas - RAPP**, Passo Fundo, Brasil. v. 9, p. 291-318, 2001.

MACHADO, J. C. **Patologia de Sementes: Fundamentos e Aplicações**. Brasília, Ministério da Educação. Lavras: ESAL/FAEPE. 107p. 1988.

MALAGUTI, G. La escobilla del algodón en Venezuela. **Agronomia Tropical**, v. 5, n. 2, p. 73-86, 1955.



MATHIESON, J. T.; MANGANO, V. Ramulose, a new cotton disease in Paraguay caused by *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Summa Phytopathologica**, v. 11, p. 115-118, 1985.

MEHTA, Y. R.; MEHTA, A. Variabilidade genética entre isolados de *Colletotrichum gossypii* do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 40-44, 2010.

MEHTA, Y. R.; AVANZI, C. A., CALVGO, E. Molecular characterization of *Colletotrichum gossypii* isolates from cotton. In: Congresso Brasileiro de Algodão, 3, 2001. **Anais...** Embrapa Agropecuaria Oeste: Mato Grosso, p. 32-35, (resumo), 2001.

MEHTA, Y. R.; ZANDONÁ, C.; BIBANCO, K.; ALMEIDA, W. P.; TEIXEIRA, E. A.; CUNHA, H. C.; ERIVALDO, J. Resposta diferencial de cultivares comerciais do algodoeiro a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Summa Phytopathologica**, v. 31, p. 142-145, 2005.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 27, p. 2-27, 2002.

MENTEN, J. O. M. Importância da semente na transmissão de patógenos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 2., **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, p. 27-40, 1986.

MONTEIRO, J. E. B. A. **Índice de favorabilidade agrometeorológica da ramulose (*Colletotrichum gossypii* pv. *cephalosporioides*) e da mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) do algodoeiro.** 2007. 109p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

NEVES, O. da S.; GRIDI-PAPP, I. L.; CAVALERI, P. A.; FERRAZ, C. A. M.; FUZZATO, M. G.; SILVA, N. M. da; SCHMIDT, W.; CORRÊA, D. M. Distribuição geográfica atual dos algodoeiros perenes no Brasil. Primeiro levantamento parcial. **Bragantia**, v.27, p.437-475, 1968.

OTTONELLO, A. M. P. Caracterização cultural, patogênica e serológica de *Colletotrichum* da antracnose e da ramulose do algodoeiro. 1992. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - ESALQ, PiracicabaSP. 1992.

PAIVA, F. A.; ASMUS, G. L.; ARAÚJO, A. E. Doenças. In: Embrapa Agropecuária Oeste. **Algodão: Tecnologia de produção**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, p. 245-272, 2001.

PERCY, R. G.; CANTRELL, R. G.; ZHANG, J. Genetic variation for agronomic and fiber properties in an introgressed recombinant inbred population of cotton. **Crop Science**, v.46, p. 1311-1317, 2006.

PEREIRA, W. V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associados à antracnose da goiaba no estado de São Paulo**. 2009. 80p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – ESALQ/USP, São Paulo, 2009.

PINTO DE MENEZES, I. P.; BARROSO, P. A. V.; HOFFMANN, L. V.; LUCENA, V. S.; GIBAND, M. Genetic diversity of mocó cotton (*Gossypium hirsutum* race *marie-galante*) from the northeast of Brazil: implications for conservation. **Botany**, v. 88, p. 765-773, 2010.

PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 89-109, 2009.

RONDON, M. N. **Caracterização biológica e filogenia molecular dos agentes etiológicos da ramulose e antracnose do algodoeiro**. Lavras: UFLA, 2013. 50p. Dissertação (Mestrado – Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.

SALVATIERRA, D. K. de; CHIAVEGATO, E. J.; SILVA, A. V. e. Intensidade da Ramulose sob semeadura convencional e direta do algodoeiro. **Bragantia**, v.68, n.2, p.435-442, 2009.

SILVA, F. A. C.; SANTOS, R. C. dos; AZEVEDO-NETO, A; GRANJA, M. M. C.; SOUZA, C. C. F. ; MELO FILHO, P. de A. Descritores bioquímicos em cultivares de algodoeiro em

resposta à inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 114-118, 2010.

SILVA-MANN, R.; SALGADO, K. C. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Variabilidade genética de isolado de complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculações em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 27-32, 2005.

SILVA, U. C. **Diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt**. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Melhoramento genético de plantas) – UFRPE, Recife, PE, 2012.

SOUTHWORTH, E. A. Anthracnose of cotton. **Journal of Mycology**, Washington, v. 6, n. 1, p. 100-105, 1890.

SUASSUNA, N. D. **Caracterização de populações de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, controle químico e resistência em algodão**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 90p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa – Viçosa, Minas Gerais, 2005.

SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M. Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: FREIRE, E. C. (Ed.) **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília: Associação Brasileira de Produtores do Algodão, p. 479-521, 2007.

SUTTON, B. C. The genus *GGlomerella* and its anamorph *Colletorichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Oxon: CAB International, p. 1-26, 1992.

TALAMINI, V.; STADINIK, M. J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADINIK, M. J.; TALAMINI, V. (Eds). **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis, SC: CCA/UFSC, p. 45-62, 2004.

TANAKA, M. A. S.; PIZZINATTO, M. A.; SOAVE, J. Método para identificação de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de

algodoeiro baseado no hábito de crescimento. I. Avaliação em laboratório. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 22, p.116-122, 1996.

VILARINHO, A. A. Desenvolvimento economico e social vs Patrimônio cultural e Genético (25/12/2006). Disponível em:  
<<http://www23.sede.embrapa.br:8080/aplic/rumos.nsf/b1bbbc852ee1057183256800005ca0ab/454fadc6bb2a4dfa03256f7a00456acf?OpenDocument>> Acesso em: 25 set 2013.

ZANOTTA, S. **Estudos morfológicos e moleculares de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides***. Instituto Biológico, 2013. 92p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Biológico, São Paulo, 2013.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Micology**. Utrecht, v. 73, n.1, p. 115-180, 2012.

WENDEL, J. F.; CRONN, R. C. Polyploidy and the evolutionary dispersed repetitive DNA has spread to new genomes since polyhistory of cotton. **Advanced Agronomy**, London, v. 78, p. 1

## Capítulo II

### **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* E**

*Colletotrichum gossypii*

## RESUMO

ALMEIDA, Vanessa Cavalcante de. **Caracterização morfológica e patogênica de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Colletotrichum gossypii***. 2013. Tese (Doutorado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba. Areia: 2013.

O algodão é uma cultura de grande importância mundial, cuja produção é afetada por diversos fungos fitopatogênicos. Entre os fungos que causam danos ao algodoeiro destaca-se o *Colletotrichum gossypii* var. *Cephalosporioides*. Informações a respeito da sistemática de espécies de *Colletotrichum* associadas ao algodoeiro são escassas. Considerando a importância da identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à cultura do algodoeiro, o objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização morfológica e patogênica de isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e de *C. gossypii* submetidos a diferentes temperaturas visando identificar possíveis diferenças entre as duas espécies. Foram utilizados cinco isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e cinco isolados de *C. gossypii* os quais foram incubados a 20, 25 e 30 °C. Foram mensurados o crescimento micelial, a esporulação, a dimensão dos conídios assim como a topografia e coloração das colônias. Os dados de caracterização cultural foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey. Os dados de patogenicidade foram analisados empregando-se o Modelo Linear Generalizado. Os resultados revelaram que houve diferenças entre os isolados em relação ao crescimento micelial e esporulação das duas espécies nas diferentes temperaturas, não tendo sido observada variação no comprimento e largura dos conídios. As temperaturas extremas, de 20 e 30 °C induziram níveis de crescimento extremo no comprimento dos conídios, mas não influenciaram na largura, enquanto a 25 e 30 °C houve maior crescimento micelial. A coloração das colônias foi uma característica pouco variável dentro dos isolados estudados em relação à temperatura, já a elevação e a margem da colônia variaram apenas a 30°C. *C. gossypii* expressou sintomas de antracnose, enquanto sintomas de ramulose foram observados apenas em plantas inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

**Palavras – chave:** Algodoeiro, Antracnose, Ramulose

## ABSTRACT

ALMEIDA, Vanessa Cavalcante de. **Morfological and pathogenic characterization of isolates of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* and *Colletotrichum gossypii***. 2013. Thesis (Ph.D. in Agronomy) - Centre for Agrarian Sciences, Federal University of Paraíba. Areia: 2013.

Upland cotton is a crop of great global importance, whose production is affected by various pathogenic fungi. Among the fungi that cause damage to cotton stands out *Colletotrichum gossypii* var. *Cephalosporioides*. Information about the systematics of *Colletotrichum* species associated with cotton plants are scarce. Considering the importance of identification of *Colletotrichum* species associated with cotton plants, the purpose of this study was to make the morphological and pathogenic characterization of isolates of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* and *C. gossypii* under different temperatures in order to identify differences between the two species. Five isolates of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* and five isolates of *C. gossypii* were incubated at 20, 25 and 30 °C. It were assessed the mycelial growth, sporulation, size of conidia as well as the topography and the color of colonies. The data of cultural characteristics were analysed through of ANOVA and the means compared by Tukey test. The data of pathogenicity tests were analyzed by the Generalized Linear Model. Based on the results it was observed that there were differences between the isolates in relation to mycelial growth and sporulation of the two species at different temperature and there was not observed variation in the length and width of conidia. Extreme temperatures of 20 to 30 °C induced extreme increase in length of the conidia, but not influence the width, whereas at 25 and 30 °C the mycelium had more growth. The color of the colonies had little variation between isolates in relation to temperature, but the rising and the edge of the colony varied only at 30 °C. *C. gossypii* expressed anthracnose symptoms, while ramulose symptoms were observed only in plants inoculated with *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

**Keywords:** Cotton, Anthracnose, Ramulosis.

## 1. INTRODUÇÃO

Diante do cenário nacional da cultura, as doenças aparecem como um grande desafio a ser enfrentado. Desde quando o algodoeiro migrou para a região Centro-Oeste, as doenças passaram a ter um papel preponderante no sistema de produção, exigindo a utilização de cultivares resistentes e o aumento expressivo no número de pulverizações direcionadas ao seu controle.

Dentre as principais doenças que afetam a cultura do algodoeiro, no Brasil, destaca-se a ramulose, causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa. Este é considerado uma variante fisiológica do patógeno causador da antracnose do algodoeiro (CIA; SALGADO, 2005). Foi detectado pela primeira vez no município de Rancharia no Estado de São Paulo em 1935 (COSTA; FRAGA JR, 1937).

A doença ocorre em quase todos os estados do país onde se cultiva o algodoeiro e tem atingido proporções quase epidêmicas em algumas regiões (LIMA; BATISTA; VIEIRA, 1999). O patógeno está presente também no Paraguai (FOLLIN; MANGANO, 1983) e na Venezuela (MALAGUTI, 1955).

Os prejuízos ocasionados pela doença são variáveis, dependendo principalmente da cultivar plantada, podendo ser de 70%, ou mais, quando a incidência é severa (SILVEIRA, 1965). No manejo da ramulose, tem sido recomendada a utilização de sementes livres do patógeno ou o tratamento de sementes, a rotação de culturas, o uso de cultivares resistentes e o controle químico da parte aérea (SUASSUNA; COUTINHO, 2007).

Um dos aspectos importantes que representa um entrave no controle da ramulose é a dificuldade de identificação do agente causal. A taxonomia de *Colletotrichum* é ambígua, portanto, uma identificação estável tem sido uma preocupação constante para estudos com a espécie.

A espécie *C. gossypii* é o nome dado ao agente causal da antracnose do algodoeiro. Uma forma virulenta da espécie causa a ramulose, encontrada só na América Latina. Considera-se que a ramulose é causada por um patógeno distinto *C.gossypii* var. *cephalosporioides*, mas, nenhuma descrição autorizada da morfologia deste patógeno tem sido reportada, e, seu micélio, conídio e apressório são geralmente similares aos de *C. gloeosporioides*. Vários autores já enfatizaram que não existem diferenças morfológicas entre



*C. gossypii* e *C. gloeosporioides* (BAILEY *et al.*, 1996). Assim, a determinação precisa da etiologia de tais doenças é essencial para a compreensão da epidemiologia das mesmas e para definição de estratégias de controle.

Levanta-se a hipótese de que os sintomas de ramulose sejam efeito da ação do patógeno quando este atinge o meristema da planta, enquanto os possíveis sintomas de antracnose seriam causados pela ação do patógeno quando este não atingisse os tecidos meristemáticos durante o processo de infecção, alcançando apenas folhas maduras e frutos.

Considerando a importância da identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à cultura do algodoeiro, bem como a escassez de informações a respeito da sistemática das espécies, o objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização morfológica e patogênica de cinco isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e cinco isolados de *C. gossypii* visando identificar possíveis diferenças entre as duas espécies.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção e preservação dos isolados

O experimento foi conduzido no laboratório de fitopatologia da Embrapa algodão-CNPA em Campina Grande-PB. Foram utilizados dez isolados, sendo cinco de *C. gossypii* (95, 109, 457-1, 457-2, CNPA 37) e os demais de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (CNPA 50, CNPA 67, CNPA 74, CNPA 86, CNPA 105), dos quais seis pertencem à coleção de isolados do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Algodão e quatro isolados doados pelo Instituto Agrônomo do Paraná foram usados para a condução dos experimentos. Tais isolados foram coletados em diferentes regiões produtoras de algodão do Brasil e encontravam-se armazenados em Castellani. Para garantir a patogenicidade dos isolados, estes foram usados para a inoculação em plantas de algodoeiro da cultivar BRS Cedro, reconhecidamente suscetível à ramulose.

De cada isolado foram obtidas culturas monospóricas. Para isso, foi preparada uma suspensão de esporos, de modo a conter 1 a 10 esporos por campo microscópico, quando examinada sobre lâmina em pequeno aumento (10x). Foi vertido 1mL da suspensão sobre a superfície de meio de cultura sólido AA (Ágar-Água) contido em placas de Petri e espalhado uniformemente com o auxílio de uma alça de Drigalski, até cobrir inteiramente a superfície do meio. As placas com os esporos foram mantidas em temperatura ambiente, durante 24 horas. Foram retirados pequenos fragmentos do meio contendo um esporo germinando, e transferidos para meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), obtendo-se dessa forma as colônias monospóricas, as quais foram posteriormente repicadas para se proceder aos testes.

### 2.2 Caracterização morfológica e cultural de isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Foram utilizados cinco isolados monospóricos de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e cinco isolados de *C. gossypii*. Para avaliar a taxa de crescimento micelial e a característica

morfológica da colônia de cada isolado, discos de colônia fúngica de 8 mm de diâmetro foram extraídos das margens das colônias, crescidas a 25 °C sob luz constante por sete dias em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Estes discos foram transferidos para o centro de novas placas de mesmo diâmetro contendo meio de cultura BDA. Para cada isolado utilizaram-se cinco repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri. As placas contendo os discos de 8 mm foram incubadas a 20, 25 e 30 °C  $\pm$  2 com fotoperíodo de 12 horas durante 14 dias.

Durante sete dias, foram feitas leituras diárias de dois diâmetros ortogonais das colônias e as médias obtidas serviram para o cálculo do diâmetro da colônia. Os valores médios do crescimento micelial foram submetidos a análise de variância e comparados pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de 5%.

Sete dias após a incubação, foi observado visualmente o aspecto morfológico de cada colônia. Para isso, levou-se em consideração a topografia e a coloração da colônia conforme recomendado (CROUS et al., 2009).

Aos 14 dias de incubação, foram obtidas suspensões de conídios. Para isso, os conídios foram removidos de cada placa com uso de 10 mL de água destilada com o auxílio de uma alça de Drigalski, sendo posteriormente filtrados em gaze. Com a suspensão de conídios, foi realizada a quantificação dos esporos sob microscópio óptico utilizando-se uma Câmara de Neubauer. Foram confeccionadas lâminas semi-permanentes para observação dos isolados quanto à forma e tamanho dos conídios, em microscópio óptico. As lâminas de cada isolado foram avaliadas, sendo caracterizados a largura e o comprimento médio de 25 conídios por isolado. Foram avaliados cinco isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e cinco isolados de *C. gossypii*, em ensaio inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri.

### **2.3 Caracterização patogênica dos isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides***

Sementes de algodoeiro da cultivar BRS Cedro, cultivar reconhecidamente suscetível à ramulose, foram plantadas em vasos plásticos com capacidade para 5 L, contendo um substrato de terra vegetal, adubado conforme as recomendações para a cultura do algodoeiro.

Os vasos foram acondicionados em casa de vegetação e apresentavam duas plantas/vaso. A inoculação foi realizada aos 35 dias após a emergência (DAE).

Para o preparo das suspensões foram colocados 10 mL de água destilada em cada placa de Petri contendo os isolados das duas espécies e, com a ajuda de uma alça de Drigalski, os conídios foram desprendidos da massa micelial. As suspensões foram filtradas para um Becker utilizando-se duas gazes cirúrgicas sobrepostas. O inóculo foi quantificado sob microscópio óptico com o auxílio de uma Câmara de Neubauer., ajustando-se a concentração para  $10^5$  conídios/mL.

A inoculação foi realizada por meio da pulverização da suspensão de esporos sobre as folhas das plântulas em duas situações distintas: 1) inoculação apenas no meristema apical onde para isso, as folhas adultas das plantas foram isoladas; 2) inoculação em folhas no estágio V4 (MARUR; RUANO, 2001) e, nesse caso, os meristemas apicais foram isolados.

Foi avaliada a patogenicidade dos isolados considerando-se a capacidade dos mesmos de causar ou não sintomas de ramulose. O ensaio foi inteiramente casualizado com cinco repetições de quatro plantas cada, com uma parcela de duas plantas/vaso. Os dados obtidos foram analisados aplicando-se o modelo linear generalizado por meio do procedimento GEMOD do software SAS<sup>®</sup> (SAS Institute).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as variáveis diâmetro da colônia (DC) e esporulação (ESP) houve interação significativa entre isolados e temperatura. Isto significa que o crescimento micelial e a esporulação ocorreram na dependência dos isolados e da temperatura. Não houve interação significativa entre isolados e temperatura para as variáveis comprimento e largura dos conídios, denotando que estas não foram dependentes desta interação (Tabela 1).

**Tabela 1.** Quadro de análise de variância para as variáveis diâmetro da colônia (cm), esporulação, comprimento e largura ( $\mu$  m) dos conídios de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

F.V.	GL	Quadrados Médios			
		Diam. Colônia	Esporulação	Comprimento	Largura
ISO (I)	9	1,9334**	36239**	0,3479**	0,0295**
Temp (T)	2	22,677**	56566**	0,4363*	0,0113*
I x T	18	1,1996**	34651**	0,0715 <sup>NS</sup>	0,0068 <sup>NS</sup>
ERRO	72	0,1174	36971	0,1140	0,0073
CV%		7,4603	49,638	28,157	27,984

NS, \*\* e \* respectivamente, não significativo, significativo a  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ .

Os isolados apresentaram desenvolvimento semelhante para a variável comprimento do conídio, exceto o isolado 457-1 que apresentou menor comprimento diferindo estatisticamente apenas dos isolados CNPA 37, 67, 86 e 105. Para a variável largura dos conídios, o isolado CNPA 37 apresentou largura significativamente superior aos isolados 457-1, CNPA 50 e 74, não diferindo estatisticamente dos isolados 95, 109, 437-2, CNPA 67, 86 e 105 (Tabela 2).

Quanto à variável temperatura observou-se níveis de crescimento semelhantes, verificando-se diferença estatística para as temperaturas mais elevadas com redução no comprimento dos conídios. Constatou-se, ainda, que não ocorreu influência das temperaturas estudadas na largura dos conídios (Tabela 2). Carvalho e Carvalho (1973) estudando o efeito da temperatura de incubação sobre o crescimento vegetativo, esporulação e morfologia de *C.gossypii* var. *cephalosporioides* verificou que os conídios produzidos em temperaturas extremas de 12 e 33 °C mostraram-se ligeiramente mais curtos que os demais.

**Tabela 2.** Valores médios de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* mensuradas por meio do comprimento e largura sob três diferentes temperaturas

Fatores	Variáveis (µm)	
	Comprimento	Largura
Isolado		
95	1,195 ab	0,310 ab
109	1,209 ab	0,313 ab
457-1	0,826 b	0,190 c
457-2	1,180 ab	0,286 cab
CNPA 37	1,308 a	0,377 a
CNPA 50	1,140 ab	0,276 cb
CNPA 67	1,305 a	0,306 ab
CNPA 74	1,094 ab	0,260 cb
CNPA 86	1,377 a	0,323 ab
CNPA105	1,354 a	0,310 ab
Temperatura		
20 °C	1,283 a	0,306 a
25 °C	1,217 ab	0,302 a
30 °C	1,096 b	0,278 a

Médias seguidas pelas mesmas letras, nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Com base no desdobramento da interação significativa entre isolados e temperaturas para as variáveis diâmetros da colônia e esporulação, observou-se que houve diferença significativa de crescimento dos isolados entre as temperaturas, sendo que as mais elevadas de 25 e 30 °C induziram maior crescimento micelial. Em relação a esta variável, os isolados de *C. gossypii* apresentaram o mesmo comportamento dos demais isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. O isolado CNPA 37 de *C. gossypii* apresentou menor crescimento micelial nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C diferindo estatisticamente dos demais isolados, com exceção apenas do isolado CNPA 67 que à 30 °C apresentou mesmo comportamento (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeito de diferentes temperaturas sobre o crescimento micelial (mm) de cinco isolados de *Colletotrichum gossypii* e cinco de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

Isolado	Temperatura		
	20 °C	25 °C	30 °C
95	4,410 aB	4,958 bdacA	5,132 cbA
109	3,938 bacB	4,843 bdacA	5,215 cbA
457-1	3,730 bcB	4,667 bdcA	4,612 cA
457-2	3,270 cC	4,482 dcB	6,630 aA
CNPA 37	2,604 dB	4,333 dA	4,326 dA
CNPA 50	4,284 baB	5,264 baA	4,819 cbA
CNPA 67	3,512 cB	4,755 bdacA	4,710 dA
CNPA 74	4,294 baB	5,206 baA	4,901 cbA
CNPA 86	3,807 bacB	5,173 bacA	4,902 cbA
CNPA105	4,398 baB	5,414 aA	5,423 bA

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, não diferem estatisticamente entre si Tukey (p<0,05)

Para a maioria das espécies de *Colletotrichum* a temperatura ideal para o crescimento vegetativo está entre a faixa de 25 °C a 30 °C (SUTTON, 1992). Maia et al., (2011) analisando a influência da temperatura no desenvolvimento das colônias de três isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de diferentes órgãos da mangueira (*Mangifera indica*) observaram que os três isolados apresentaram melhor crescimento micelial na faixa de temperatura de 20 a 25 °C. Tozze Junior, Mello e Massola-Junior (2006), verificaram ao analisar o crescimento de colônias de isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de solanáceas, que o melhor desenvolvimento das colônias deu-se na faixa de temperatura entre 25 °C e 28°C. Mello, Machado e Bedendo (2004), estudando o desenvolvimento de *C. gloeosporioides* isolado de pimentão (*Capsicum annuum*) em diferentes temperaturas observaram que as temperaturas mais amenas (20 e 25 °C) são mais adequadas para este gênero. Feitosa et al., (1977) determinaram, por meio de equação do segundo grau, a temperatura de 28 °C como o ponto de máximo crescimento para isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes do cafeeiro (*Coffea arabica*). Os autores observaram o incremento no crescimento com a elevação da temperatura até 28 °C, e a temperatura ótima de crescimento também dependeu do isolado, ocorrendo entre 25 °C e 30 °C.

Em relação à variável esporulação, observou-se que os isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em geral, esporularam menos que os isolados de *C. gossypii*, verificando-se na temperatura de 20 °C maiores índices de esporulação para os isolados CNPA 37 e 105. Na temperatura de 25 °C, constatou-se nível de esporulação significativamente superior para o isolado 95 quando comparado com as demais temperaturas e isolados (Tabela 4).

Considerando-se a esporulação de cada isolado nas diferentes temperaturas, os isolados CNPA 37 de *C. gossypii* e CNPA 105 de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* se comportaram significativamente diferente nas três temperaturas avaliadas, diminuindo o nível de esporulação com o aumento da temperatura. Com relação ao efeito da temperatura na esporulação existem estudos considerando que a doença provocada por *Colletotrichum* spp. é prejudicial sob condições de temperatura mais amenas (KING et al., 1997; KUROZAWA; PAVAN, 1997).

**Tabela 4.** Efeito de diferentes temperaturas sobre a esporulação de cinco isolados de *Colletotrichum gossypii* e cinco de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

Isolado	Temperatura		
	20 °C	25 °C	30 °C
95	14503 aB	18620 aA	12783 aB
109	6011,5 bA	2520,8 cdB	4493,3 cbBA
457-1	977,00 cA	726,00 dA	813,00 cdA
457-2	1206,6 cB	3996,6 cbdBA	5052,2 bA
CNPA 37	13000 aA	5267,2 cbB	1897,0 cbdC
CNPA 50	114,00 cA	535,00 dA	53,000 dA
CNPA 67	278,2 cA	127,40 dA	22,000 dA
CNPA 74	413,8 cA	80,260 dA	19,500 dA
CNPA 86	364,4 cA	394,80 dA	919,00 cdA
CNPA105	13080 aA	7687,5 bB	3115,0 cbdC

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, não diferem estatisticamente entre si Tukey (p<0,05)

Para fungos do gênero *Colletotrichum* a temperatura ótima para esporulação e germinação de conídios pode variar muito. Goos e Tschirsch (1962) citaram a faixa de 27-30 °C de *C. musae*, enquanto Cox e Irwin (1988) de 26-28 °C. Entretanto, para outras espécies de



*Colletotrichum*, a faixa ótima pode variar de 20-30 °C, como é o caso do crescimento de *C. gloeosporioides* do maracujazeiro (*Passiflora edulis*), de *C. coccodes* sendo 16 °C a melhor temperatura para esporulação de *C. lagenarium* (COUTO; MENEZES, 2004).

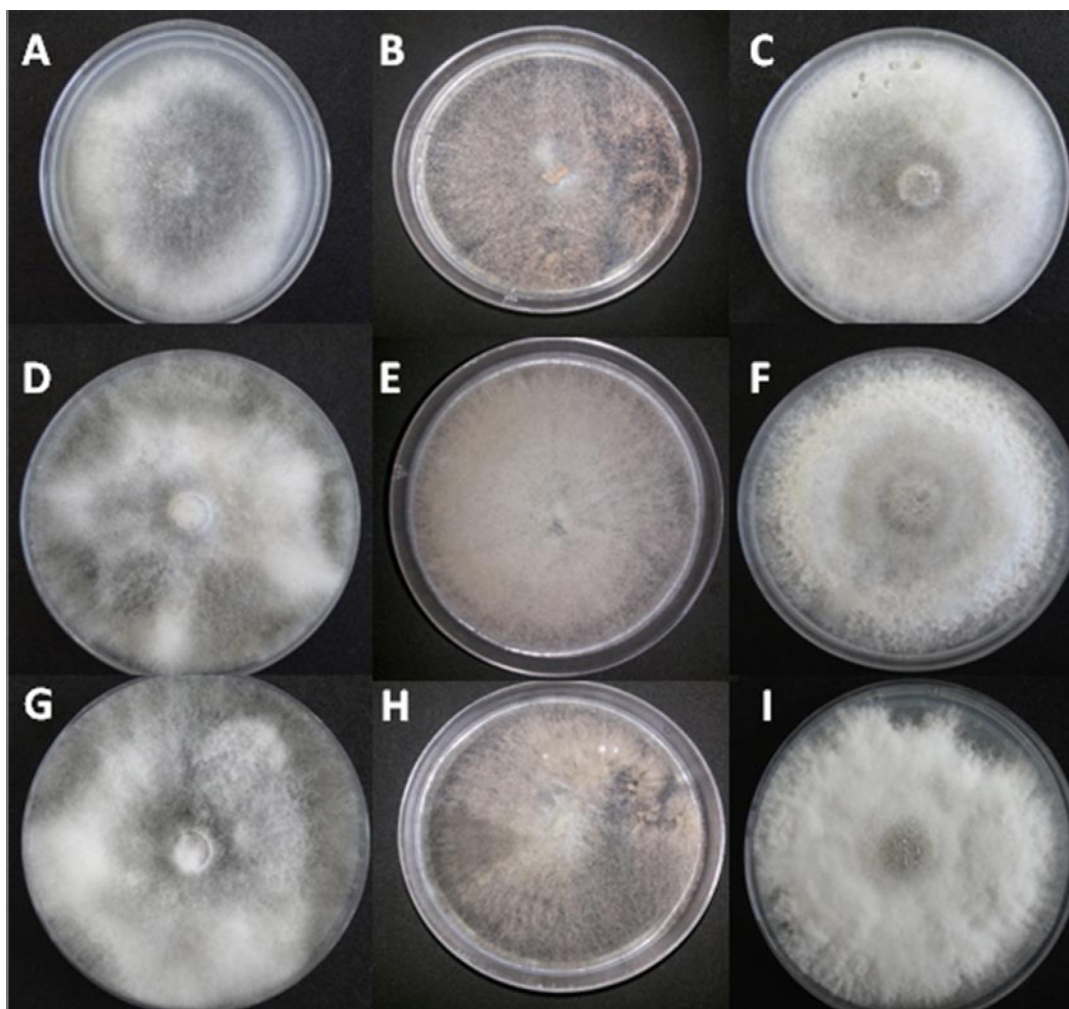
A temperatura também está relacionada com a transmissibilidade de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em culturas de algodoeiro como comprovado por Araújo *et al.*, (2005), os quais obtiveram incidência e severidade da doença maiores com o aumento da temperatura (25 e 30 °C). Monteiro, Sentelhas e Chiavegato (2007), estudando o efeito da temperatura na ocorrência de infecção do fungo causador da ramulose do algodoeiro verificaram que a máxima severidade da doença ocorreu na faixa de 20 a 30 °C, diminuindo em temperaturas mais quentes ou mais frias que esse intervalo. Segundo o mesmo autor, essa faixa relativamente ampla de temperatura favorável ao desenvolvimento da ramulose justifica a importância de selecionar genótipos resistentes a esta doença, uma vez que essa faixa de temperatura ocorre frequentemente em todas as áreas produtoras de algodoeiro no Brasil, tornando a cultura vulnerável às epidemias em cultivares suscetíveis quando na presença de inóculo.

A coloração das colônias foi uma característica pouco variável dentro dos isolados estudados de acordo com a temperatura. Os isolados 95, 109, 437-1 de *C. gossypii*, e CNPA 67, 74, 86 e 105 de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* apresentaram coloração semelhante em todas as temperaturas. O isolado de *C. gossypii*, CNPA 37, apresentou coloração cinza com tons rosados, sendo essa coloração diferente na temperatura de 30 °C. O isolado CNPA 50 comportou-se de forma diferente na temperatura de 25 °C (Tabela 5). As colônias apresentaram mudanças de tonalidades dentro desses isolados, principalmente quando da replicação do mesmo (Figura 1). Vale salientar que as cores das colônias variaram dentro das tonalidades de cores descritas para o gênero *Colletotrichum* de acordo com Sutton (1992). Variações de coloração de isolados de *Colletotrichum* spp. já foram confirmadas por Maia *et al.* (2011) e Várzea (1995), ratificando que diferenças na coloração de isolados de *Colletotrichum* spp. é uma característica muito variável.

Quanto à topografia da colônia as características de elevação e margem da colônia apresentaram variação apenas à 30 °C (Tabela 5).

**Tabela 5.** Características culturais de dez isolados de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

Isolado	Coloração da colônia	Elevação da colônia	Margem da colônia	Setores
<b>20 °C</b>				
95	Rosada	Plana	Inteira	+
109	Cinza	Plana	Inteira	-
457-1	Cinza claro	Plana	Inteira	-
457-2	Cinza claro	Plana	Inteira	-
CNPA 37	Rosada/cinza	Plana	Inteira	-
CNPA 50	Cinza/bordas claras	Levantada	Inteira	-
CNPA 67	Cinza claro	Levantada	Inteira	-
CNPA 74	Cinza	Levantada	Inteira	-
CNPA 86	Cinza claro	Plana	Inteira	-
CNPA105	Cinza claro	Plana	Inteira	-
<b>25 °C</b>				
95	Rosada	Plana	Inteira	+
109	Cinza	Plana	Inteira	-
457-1	Cinza claro	Plana	Inteira	-
457-2	Rosada/cinza	Plana	Inteira	-
CNPA 37	Rosada/cinza	Plana	Inteira	+
CNPA 50	Cinza	Levantada	Inteira	-
CNPA 67	Cinza claro	Levantada	Inteira	-
CNPA 74	Cinza	Levantada	Lobada	-
CNPA 86	Cinza claro	Levantada	Inteira	-
CNPA105	Cinza claro	Levantada	Inteira	+
<b>30 °C</b>				
95	Rosada/cinza	Plana	Ondulada	+
109	Cinza	Plana	Inteira	-
457-1	Cinza claro	Plana	Inteira	-
457-2	Rosada/cinza	Plana	Ondulada	-
CNPA 37	Cinza claro	Plana	Inteira	+
CNPA 50	Cinza/bordas claras	Levantada	Lobada	+
CNPA 67	Cinza claro	Umbonada	Lobada	-
CNPA 74	Cinza	Levantada	Lobada	-
CNPA 86	Cinza claro	Plano	Lobada	-
CNPA105	Cinza claro	Levantada	Inteira	-



**Figura 1.** Placa dos isolados de *Colletotrichum*

Nota: A) Isolado CNPA 74, 20 °C; B) Isolado 95, 20 °C; C) Isolado CNPA 37, 20 °C; D) Isolado CNPA 74, 25 °C; E) Isolado 95, 25 °C; F) Isolado CNPA 37, 25 °C; G) Isolado CNPA 74, 30 °C; H) Isolado 95, 30 °C; I) Isolado CNPA 37, 30 °C.

As plantas da variedade BRS Cedro, reconhecidamente suscetível à ramulose, submetidas à inoculação na região do meristema e nas folhas em estágio V4 (MARUR; RUANO, 2001) apresentaram reações diferentes em relação à espécie em estudo inoculada. Quando as plantas foram inoculadas com suspensão de *C. gossypii* na região meristemática, não expressaram sintomas de necrose foliar ou de superbrotamento. Por outro lado, sintomas de antracnose foram identificados nas folhas em estágio de desenvolvimento V4 quando o patógeno foi inoculado nas mesmas neste estágio (Tabela 6).

Foram observados sintomas de ramulose, sobretudo necrose foliar com sintoma de mancha estrelada, típico das fases iniciais da doença, bem como quebra de dominância apical,

em plantas inoculadas no meristema por uma suspensão utilizando os isolados considerados como sendo de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, ao passo que quando a mesma suspensão foi inoculada em folhas no estágio V4 não foram identificados sintomas da doença.

**Tabela 6.** Reação das plantas de algodoeiro da variedade BRS Cedro inoculadas com *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

Isolado	Sintomas nas folhas	Sintomas nos meristemas
95	Presente	Ausente
109	Presente	Ausente
457-1	Presente	Ausente
457-2	Presente	Ausente
CNPA 37	Presente	Ausente
CNPA 50	Ausente	Presente
CNPA 67	Ausente	Presente
CNPA 74	Ausente	Presente
CNPA 86	Ausente	Presente
CNPA105	Ausente	Presente

De um modo geral espécies de *Colletotrichum* têm sido identificadas e separadas de acordo com suas características morfológicas. Entre as principais características utilizadas pelos taxonomistas destacam-se a morfologia dos conídios, considerando-se tamanho e forma e morfologia dos apressórios; presença ou ausência de setas; formação de escleródios, acérvulos e estágio teleomorfo; coloração e textura da colônia; produção de pigmentos e taxa de crescimento (HYDE et al., 2009). Sendo assim, tradicionalmente, espécies de *Colletotrichum* são diferenciadas com base em caracteres morfológicos e culturais. Entretanto, este critério isoladamente nem sempre é adequado para oferecer uma diferenciação realista entre as espécies deste gênero devido ao fato de que a morfologia e o fenótipo entre as espécies pode sofrer alterações decorrentes de fatores do ambiente (HYDE et al., 2009). Um fator que exerce grande influência no desenvolvimento de gênero *Colletotrichum* é a temperatura sendo uma das principais variáveis climáticas responsáveis pela infecção e colonização por esse patógeno (DIAS et al., 2005).

No que se refere especificamente a *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* Tanaka e Manten (1992) estudaram o hábito de crescimento de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* visando sua diferenciação em testes de sanidade de sementes, dada a necessidade de identificar este último, tendo em vista a sua importância epidemiológica. Os autores observaram que nas sementes com *C. gossypii* o micélio exibe uma coloração mais rosada em decorrência da grande massa de conídios que se forma devida à abundante esporulação. O micélio geralmente não está presente ou é escasso. As estruturas se desenvolvem rente ao tegumento e o micélio é mais compacto. No caso de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* o micélio aéreo é mais abundante e apresenta aspecto menos compacto. Neste trabalho, embora os isolados 86 e 105 de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* tenham apresentado colônias planas sob a temperatura de 20 °C, os isolados de *C. gossypii* apresentaram essa característica quando submetido a crescimento nas três temperaturas estudadas.

Sem levar em consideração as controvérsias existentes em relação à taxonomia deste *C. gossypii*, aventou-se a possibilidade de que os sintomas de ramulose fossem causados, quando o inóculo entra em contato ocasionalmente com o meristema da planta, enquanto os sintomas de antracnose seriam expressos quando o inóculo não atingindo o meristema, entra em contato com folhas em estágio vegetativo variando entre V4 e V5 de acordo com a escala de Marur e Ruano (2001). Observou-se neste estudo que *C. gossypii* não causa sintomas característicos de ramulose quando em contato com o meristema. Os resultados obtidos neste trabalho concordam com aqueles já verificados por Costa (1941) e Tanaka e Menten (1992) os quais consideram que a ramulose é de fato causada por uma variante de *C. gossypii* cujos sintomas induzidos às plantas de algodoeiro e as características de crescimento diferem daqueles observados nesta espécie.

#### 4. CONCLUSÕES

1. Houve diferenças entre os isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* para o crescimento micelial e esporulação em relação à temperatura, o mesmo não foi observado para as variáveis comprimento e largura dos conídios.
2. Os conídios apresentaram maior dimensão tanto em largura quanto em comprimento na temperatura de 20 °C, enquanto as temperaturas de 25 e 30 °C induziram maior crescimento micelial.
3. A coloração das colônias foi uma característica pouco variável dentro dos isolados estudados de acordo com a temperatura, já as características de elevação e margem da colônia apresentaram variação apenas a 30 °C.
4. As plantas da variedade BRS Cedro, reconhecidamente suscetível à ramulose, apresentam reações diferentes em relação à espécie em estudo inoculada: *C. gossypii* expressou sintomas de antracnose, enquanto sintomas de ramulose foram observados em plantas inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, D. V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; ZAMBENEDETTI, E. B.; CELANO, F. A. O.; CARVALHO, E. M.; CAMARGOS, V. N. Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**. v.31, n.1, 2006.

BAILEY, J. A.; NASH, C.; MORGAN, L. W.; O'CONNELL, R. J.; TEBEEST, D. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing Anthracnose on the Malvaceae. **Phytopathology**, St Paul, v.83, n.10, p. 1076-1083, 1996.

CARVALHO, Y de; CARVALHO, C. G. DE S. Efeitos da temperatura de incubação sobre o fungo *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides*. In: E.A.V. – UFGO, 1, Goiás. **Anais...** Goiás, 1973. p. 1-11.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; et al. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**, 4. ed., São Paulo: Agronômica Ceres, . v. 2, 2005. p.41- 52.

COSTA, A. S.; FRAGA JR. C. G. Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro. **Revista Agrícola Piracicaba**, v. 12, p. 249-259, 1937.

COSTA, A. S. **Investigações sobre ramulose**. Seção de Algodão, n. 1012. Campinas, Instituto Agronômico. Campinas. 1941. 42p.

COUTO, E. F.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**. v.29, n.4, p. 406-412, 2004.

COX, M. L. & IRWIN, J. A. G. Conidium and apressorium variation in Australian isolates of the *Colletotrichum gloeosporioides* group and closely related species. **Australian Systematic Botany**. n.1, p. 139-144, 1988.

CROUS, P. W.; VERKLEY, G. J. M.; GROENEWALD, J. Z.; SAMSON, R. A. Descriptive terms and colony characteristics. In: **Fungal Biodiversity**. CBS-KNAW – Fungal Biodiversity Centre Utrecht, The Netherlands, 2009. p. 205-206.

DIAS, M. D., POZZA, E. A., ABREU, M. S.; OROZCO MIRANDA, E. F. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, p. 545- 552, 2005.

HYDE, K. D.; CAI, L.; Mc.KENZIE, E. H. C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue confusion. **Fungal Diversity**, *on line*. v. 39, p. 197-211, 2009. In: <<http://www.fungaldiversity.org/fdp/jinds2.php#vol27>>. Acesso em 18 de agosto de 2012.

FEITOSA, M. I.; FEICHTENBERGER, M.; KUDAMATSU, M.; ROSSETTI, V.; LEITE, R. Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L, no Estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 44, n. 1/2, p. 33-54, 1977.

FOLLIN, J. C.; MANGANO, V. Etude sur la ramulose du cotonnier: comparaison Du *Colletotrichum* responsable à *C. gossypii* South. Conditions d'attaques. **Cotton Fiber Tropical**, v. 38, n. 2, p. 209-215, 1983.

GOOS, R.D. & TSCHIRSCH, M. Effect of environmental factors on spore germination, spore survival, and growth of *Gloeosporium musarum*. **Mycologia** n.54, p. 353-367, 1962.

HILLOCKS, R.J. Fungal Diseases of the Leaf. In: HILLOCKS, R.J. (Ed.) **Cotton Diseases**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 191-238.

LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S.; VIEIRA, R. M. Principais doenças do algodoeiro e seu controle. In: Beltrão, N.E.M. (ed.). **A cultura do algodão**. EMBRAPA-CNPA: Campina Grande, 1999. p. 715-752.

MAIA, F. G. M.; ARMESTO, C.; ZANCAN, W. L.; MAIA, J. B.; ABREU, M. S. de; Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de



*Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 2, p. 205-210, 2011.

MALAGUTI, G. La escobilha del algodón em Venezuela. **Agronomia Tropical**, v. 5, n. 2, p. 73-86, 1955.

MARUR, C. J.; RUANO, O. A. A reference system for determination of developemntal stages of upland cotton. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v.5, n.2, p. 313-317, 2001.

MELLO, A. F. S.; MACHADO, A. C. Z.; BEDENDO, I. P. Development of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from green pepper in different culture media, temperatures, and light regimes. **Science Agricola**. (Piracicaba, Braz.), v.61, n.5, p. 542-544, 2004.

MONTEIRO, J. E. B. A.; SENTELHAS, P. C; CHIAVEGATO, E. J. Modelo de infecção de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em função da temperatura e do molhamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 6, 2007, Uberlândia. **Resumos...** Uberlândia, 2007.

SAS Institute. **SAS/STAT Software 9.2**. Cary Nc: SAS Institute, 2011. Licensed to Embrapa.

SHENOY, B.D.; JEEWON, R.; LAM, W.H., BHAT, D.J., TAN, P.P.; TAYLOR, P.W.J; HYDE, K.D. Morpho-molecular characterization and epitypificatin of *Colletotrichum capsici* (Glomerellaceae, Sordariomycetes), the causative agent of anthracnose in chilli. **Fungal Diversity**, v. 27, n. 1, p. 197-211, 2007.

SILVEIRA, A. P. Moléstias: fungos e bactérias. In: Neves et al. (Ed.). **Cultura e adubação do algodoeiro**, São Paulo, POTASSA, 1965. p.417-433.

SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M. Manejo das principais doenças do algodoeiro no Cerrado brasileiro. In: Freire, E. C. (Ed.). **Algodão no cerrado do Brasil**. Brasília, 2007. p. 479-521.

SUTTON, B.C. The coelomycetes. Fungi aimperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. **Commonwealth Mycological Institute**, Kew, England, 1980.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. In: Bayley, J. A.; Jeger, M. J. (Ed.). ***Colletotrichum, biology, pathology and control***. Wallingford: C. A. B. international, 1992. p. 1-26.

TANAKA, M.A.S.; NENTEN, J.O.M.; MACHADO, J.C. Hábito de crescimento de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro. ***Bragantia***, Campinas, v. 55, n. 1, p. 95-104, 1992.

TOZZE JUNIOR, H. J.; MELLO, B. A.; MASSOLA-JUNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. ***Summa Phytopathologica***. Botucatu, v. 32, n. 1, p. 77-79, 2006.

VARZEA, V. M. P. **Variabilidade em *Colletotrichum* spp. de cafeeiro. Pesquisa de fontes de resistência ao *C. kahawae***. 1995. 128 f. Dissertação (Investigador auxiliar) – Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa, Portugal, 1995.

## Capítulo III

### **MARCADORES MOLECULARES PARA DIFERENCIAÇÃO DE**

*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* **E** *Colletotrichum gossypii*

## RESUMO

ALMEIDA, Vanessa Cavalcante de. **Marcadores Moleculares para diferenciação de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Colletotrichum gossypii***. 2013. Tese (Doutorado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba. Areia: 2013.

A identificação tradicional de *Colletotrichum* spp. é realizada usando, principalmente, critérios morfológicos. Atualmente, além das técnicas morfológicas tradicionais, espécies de *Colletotrichum* têm sido identificadas usando ferramentas de diagnóstico molecular. Vários tipos de marcadores moleculares têm sido empregados para análise de identificação e variabilidade de fungos. O objetivo desse trabalho foi avaliar o uso de marcadores moleculares para diferenciação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Foram analisados o DNA de cinco isolados de *C. gossypii* e cinco de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* com os marcadores moleculares ERIC-PCR, ISSR, IRAP, REMAP e Box-PCR. A combinação dos cinco marcadores analisados amplificou 54 locos, dos quais 48% foram polimórficos. O marcador mais informativo foi o ERIC-PCR. Os padrões de bandas de DNA foram empregados para cálculo dos valores de similaridade genética, os quais mostraram similaridade mínima de 55% e máxima de 100%. O dendograma apresentou dois grupos distintos, um grupo incluindo todos os isolados caracterizados como *C. gossypii* e o outro com agrupamento dos isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* indicando que as técnicas moleculares baseadas na combinação dos marcadores ERIC-PCR, ISSR, IRAP, REMAP e Box-PCR foram eficientes para diferenciar *C. gossypii* de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

**Palavras – chave:** Ramulose, Antracnose, Marcadores de DNA

## ABSTRACT

ALMEIDA. Vanessa Cavalcante de. **Molecular markers for the differentiation of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Colletotrichum gossypii*.** Thesis (Ph.D. in Agronomy) - Centre for Agrarian Sciences, Federal University of Paraíba. Areia: 2013.

The traditional identification of *Colletotrichum* spp. is performed using mainly morphological criteria. Currently, in addition to traditional morphological techniques, *Colletotrichum* species have been identified using molecular diagnostic tools. Several types of molecular markers have been used for variability analysis and identification of fungi. The aim of this study was to evaluate the use of molecular markers for differentiation of *C. gossypii* and *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Were analyzed DNA of five isolates of *C. gossypii* and five of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* with molecular markers ERIC-PCR, ISSR, IRAP, REMAP and Box-PCR. The combination of the five markers amplified 54 loci, of which 48% were polymorphic. The most informative marker was ERIC-PCR. The patterns of DNA bands were used to calculate the values of genetic similarity, which showed minimal similarity of 55% and a maximum of 100%. The dendrogram showed two distinct groups, one including all isolates characterized as *C. gossypii* and the other group of isolates of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* indicating that molecular techniques based on the combination of markers ERIC-PCR, ISSR, IRAP, REMAP and Box-PCR were efficient to differentiate *C. gossypii* of *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

**Keywords:** Ramulosis, Anthracnose, DNA markers

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum* inclui várias espécies fitopatogênicas (BAILEY e JEGER, 1992) responsáveis por enormes perdas econômicas. *Colletotrichum gossypii* é o causador da antracnose e ataca o sistema radicular das plântulas e maçãs, porém normalmente não causa danos econômicos para a cultura. *C. gossypii* var. *cephalosporioides* é responsável pela ramulose e ataca toda a parte aérea da planta, provocando severos danos no rendimento do algodão (MEHTA; MEHTA, 2010).

A identificação de *Colletotrichum* spp. é realizada usando, principalmente, critérios morfológicos. Além das técnicas morfológicas, espécies de *Colletotrichum* têm sido identificadas usando ferramentas de diagnóstico molecular (HYDE et al., 2009). Devido à elevada plasticidade das características morfológicas que são influenciadas por variações ambientais e a existência de formas morfológicas intermediárias, estes critérios podem ser inadequados para diferenciar espécies de *Colletotrichum* (PHOTITA et al. 2005). As técnicas moleculares oferecem alternativa aos métodos de identificação taxonômica e demais estudos envolvendo fitopatógenos (ABANG et al., 2003; BORMAN et al., 2008).

A diferenciação de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* de *C. gossypii* que se desenvolvem sobre as sementes de algodoeiro, é muito difícil quando se utilizam métodos rotineiros de patologia de sementes como incubação em papel de filtro, plaqueamento em ágar e outros, comprometendo a confiabilidade dos métodos usuais disponíveis (ZANOTTA, 2013).

Com os avanços na área de biologia molecular, vêm sendo desenvolvidas pesquisas com o objetivo de estudar a taxonomia, a variabilidade genética e a identificação de fungos fitopatogênicos, empregando-se técnicas baseadas em marcadores moleculares.

Existem vários tipos de marcadores moleculares e dentre esses, os baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat Amplification), ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus). Além destes, vários marcadores moleculares baseados em elementos transponíveis tem sido empregado com êxito para o monitoramento de populações de patógenos. Em fungos, os marcadores que utilizam sequências de retrotransposons mais utilizados são IRAP (inter-retrotransposon

amplified polymorphism) e o REMAP (retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism) (SANTOS et al., 2011).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o uso de marcadores moleculares para diferenciação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

Foram analisados 10 isolados, sendo cinco pertencentes à espécie *C. gossypii* (95, 109, 457-1, 457-2, CNPA 37) e cinco da espécie *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (CNPA 50, CNPA 67, CNPA 74, CNPA 86, CNPA 105). De cada isolado foram obtidas culturas monospóricas preparando-se uma suspensão de esporos, de modo a conter 1 a 10 esporos por campo microscópico, quando examinada sobre lâmina em pequeno aumento (10x). Foi vertido 1mL da suspensão sobre a superfície de meio de cultura sólido AA (Ágar-Água) contido em placas de Petri e espalhado uniformemente com o auxílio de uma alça de Drigalski, até cobrir inteiramente a superfície do meio. As placas com os esporos foram mantidas em temperatura de 25 a 28 °C, durante 24 horas. Foram retirados pequenos fragmentos do meio contendo um esporo germinando, e transferidos para meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Tais isolados foram incubados em meio BDA a 25 °C sob luz constante por 14 dias, em placas de Petri de 9 cm de diâmetro.

### 2.2 Extração de DNA

Culturas fúngicas incubadas em BDA (Batata-Dextrose-Ágar) por 14 dias foram raspadas a partir da superfície de Agar para a extração do DNA genômico, utilizando-se o método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1990), com modificações propostas por Barroso et al. (2006). Os fragmentos de micélio foram colocados em tubos de 2 mL acrescidos de 600 µ L de tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 0,2 M EDTA; 0,1 M Tris HCl pH 8,0; 2,0% PVP e 0,2% de β-mercaptoetanol) dentro dos quais foi adicionada uma esfera de aço inoxidável para maceração das amostras. Os tubos foram incubados em banho-maria por 30 minutos a 65 °C, sendo agitados a cada 5 minutos. Retirados do banho-maria, os microtubulos foram deixados esfriar até atingirem a temperatura ambiente. Em capela de exaustão, foram adicionados 600 µ L de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1 (v/v). Por inversão, os tubos foram agitados até a obtenção de uma emulsão homogênea.



Os tubos foram centrifugados a 11700 g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, em 600 µ L de isopropanol frio (-20 °C) foram adicionados. Por inversão, o material foi misturado para que ocorresse a precipitação do ácido nucléico. Os tubos foram incubados por 30 minutos a -20 °C e centrifugados a 11700 g por 10 minutos a 4 °C. O *pellet* coletado foi lavado duas vezes com 500 µ L de etanol 70% gelado, e 300 µ L de etanol absoluto também gelado, e deixado secar por 10 a 30 minutos a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspenso em 100 µL de tampão T.E. (100 mM Tris; 1 mM EDTA).

A quantificação do DNA purificado foi realizada utilizando alíquotas de cada genótipo de cada isolado, que foram comparadas com uma série de concentrações conhecidas de DNA do fago Lambda ( $\lambda$ ) (50 a 300 ng), através da intensidade fluorescência observadas em gel de agarose 0,8% (p/v) submetidos à eletroforese. O gel foi visualizado em transiluminador sob luz UV, após a coloração com Syber Green. O DNA foi diluído em água *milliq* para concentração de 10 ng/µ L, para utilização nas reações de amplificação.

### 2.3 Condições de Amplificação

As reações de amplificação foram realizadas com os marcadores ERIC-PCR (ERIC1R e ERIC2), ISSR (UBC 885), IRAP (CLIRAP4), REMAP (CLIRAP4 e UBC 811) e Box-PCR (BOX1R) utilizando como iniciadores os oligonucleotídeos descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos utilizados nas análises com marcadores moleculares

Oligonucleotídeo	Sequência
ERIC1R	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'
ERIC2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'
UBC 885	5'-BHB GAG AGA GAG AGA GA-3'
CLIRAP4	5'-CTTTTGACGAGGCCATGC-3'
UBC 811	5'-CTTTTGACGAGGCCATGC-3'
BOX 1R	5'-CTCCGGCAAGGCGACGCTGAC-3'

Para a análise molecular com o marcador ERIC-PCR as reações foram realizadas com: 1X de tampão (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.4, 1% de Triton X-100), 2 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de cada dNTP, 50 ng de DNA, 0,5 mM de cada primer e 1 U da Taq. polimerase. As reações de PCR foram realizadas com os seguintes ciclos. Desnaturação inicial 94°C por 2 minutos, 35 ciclos com desnaturação de 94 °C por 1 min, anelamento 45,5 °C por 1,5 min. Síntese 72 por °C 2 min. Síntese final: 72°C, por 8 minutos.

Para o marcador ISSR utilizou-se 1X tampão (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.4, 1% de Triton X-100), 2 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de cada dNTP, 50 ng de DNA, 0,5 mM de cada primer e 1 U da Taq. polimerase. As condições de amplificação foram: 3 min a 94 °C para desnaturação inicial, seguindo-se os 40 ciclos, cada um consistiu de 94 °C por 30 s, 46 °C por 2 min, 72 °C por 2 min, e uma extensão final a 72 °C por 7 min.

Com os marcadores IRAP e REMAP as reações foram realizadas contendo 50 ng de DNA, tampão 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,55, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e 0,01% Tween 20), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada primer, 0,2 mM de dNTPs, e 1,5 U de TAq DNA Polimerase. As condições de amplificação foram: 1 ciclo a 94 °C por 2 min; 40 ciclos de 94 °C por 30 s; de 50 °C por 30 s; e 72 °C por 2 min e uma extensão final de 72 °C por 10 min.

Para Box-PCR as reações foram realizadas contendo 1X de tampão (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.4, 1% de Triton X-100), 3 mM de cloreto de magnésio, 0,25 mM de cada dNTP, 50 ng de DNA , 2 mM de cada primer e 1U da Taq. polimerase. As reações de PCR foram realizadas com os seguintes ciclos: Desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos com desnaturação de 94 °C 1 min, anelamento 50 °C por 1,5 min. Síntese 68 °C, por 8 min. Síntese final 68 °C por 8 minutos.

Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizados no transluminador (Loccus Biotecnologia, BRA).

## **2.4 Análise dos Dados**

Os diferentes padrões de amplicons entre os isolados foram avaliados visualmente. As bandas para cada iniciador utilizados na amplificação seletiva foram identificadas com o número um (presença) e zero (ausência). As estimativas de similaridade genética entre os isolados foram efetuadas pelo coeficiente de Jacard usando o programa NTSYS – PC 2.1 (ROHLF, 2000). A matriz de similaridade foi empregada para construir o dendograma e a

análise de agrupamento foi realizada pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

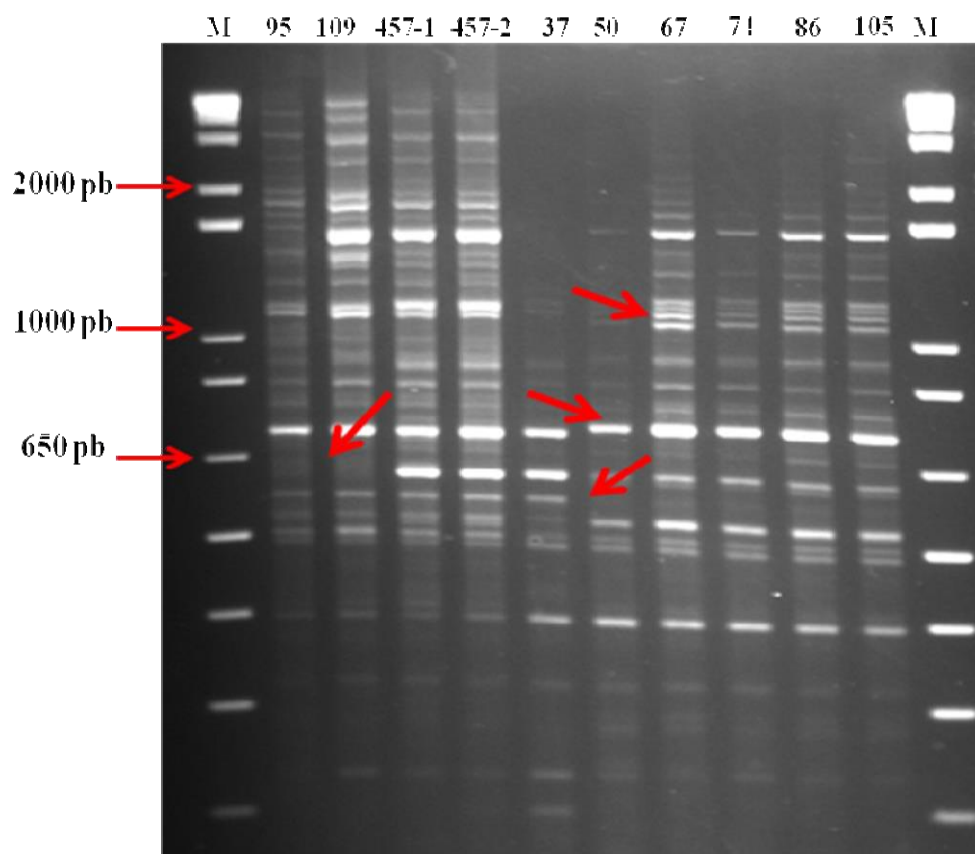
Nas análises com os marcadores moleculares utilizou-se ERIC-PCR, ISSR, IRAP, REMAP e Box-PCR (Tabela 2). Os marcadores ERIC-PCR e REMAP amplificaram o maior número de locos (14) seguidos do IRAP que amplificou 11 locos, do ISSR (8 locos) e do Box-PCR (7). O marcador mais informativo foi o ERIC-PCR, apresentando 71% de polimorfismo e o menos polimórfico foi o IRAP (27%).

**Tabela 2.** Características dos marcadores ERIC-PCR, ISSR, IRAP, REMAP e Box-PCR para *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

Marcador	Locos amplificados	Locos polimórficos	Locos Monomórficos	% de Locos polimórficos
ERIC-PCR	14	10	4	71
ISSR	8	5	3	63
IRAP	11	3	8	27
REMAP	14	6	8	43
Box-PCR	7	2	5	29

A combinação dos cinco marcadores analisados amplificou 54 locos, sendo 48% polimórficos. A Figura 1 mostra um padrão de amplificação obtido com o marcador ERIC-PCR.

Sequências do tipo ERIC-PCR foram desenvolvidas para genotipagem e discriminação de bactérias (VERSALOVIC et al., 2001), mas também tem mostrado eficiência na caracterização de fungos, inclusive dos pertencentes ao *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (MEHTA et al., 2001; MEHTA; MEHTA, 2010).



**Figura 1.** Perfil eletroforético do DNA de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* gerado por ERIC-PCR. M - marcador

Santos et al. (2011) analisando 54 isolados de *C. lindemuthianum* pertencentes a 24 raças diferentes com os marcadores IRAP e REMAP observaram que um total de 45 locos foram amplificados, sendo 26 amplificados por IRAP e 19 por REMAP, apresentando um total de 62% de locos polimórficos.

Os padrões de bandas de DNA foram empregados para cálculo dos valores de similaridade genética, os quais mostraram similaridade mínima de 55% e máxima de 100%. De acordo com a similaridade genética entre os pares de genótipos analisados (Tabela 3), a maioria dos isolados são muito semelhantes, sendo que os isolados 67 e 86; 67 e 105; 86 e 105 todos *C. gossypii* var. *cephalosporioides* apresentaram a maior similaridade (100%). Desta forma, fica evidente a alta correlação entre os resultados dos marcadores e os de caracterização morfológica de colônia.

**Tabela 3.** Estimativa de similaridades genéticas entre dez isolados de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, baseadas em dados de ERIC-PCR, ISSR, IRAP, REMAP e BOX-PCR, pelo coeficiente de Jacard

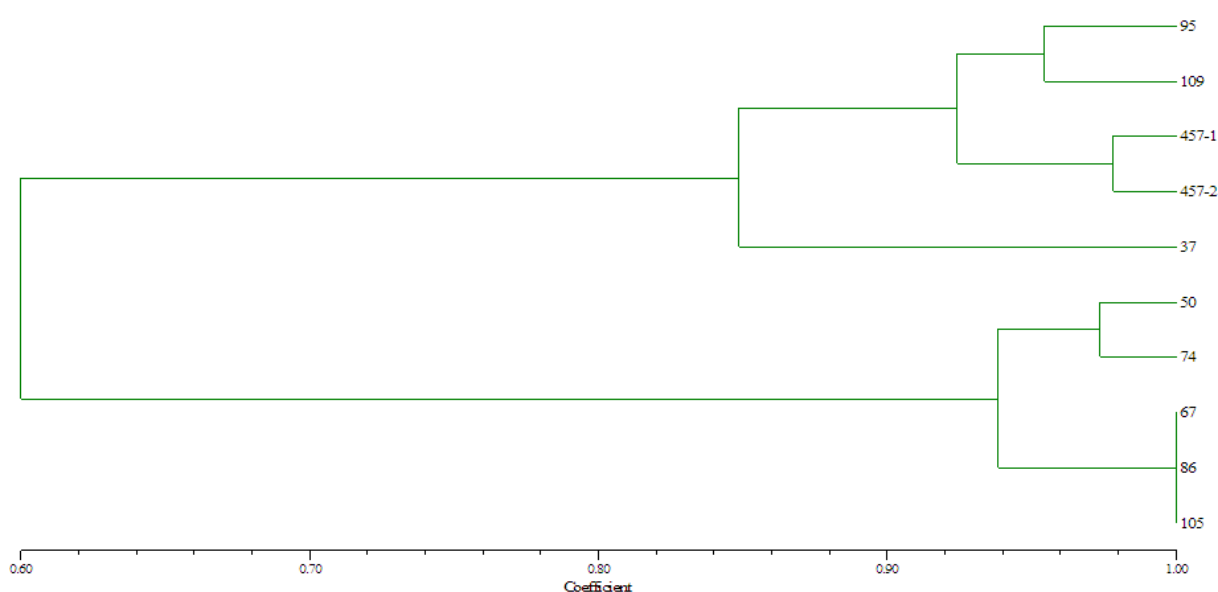
Isolado	95	109	457-1	457-2	37	50	67	74	86
<b>109</b>	0,9545								
<b>457-1</b>	0,8936	0,9347							
<b>457-2</b>	0,9130	0,9555	0,9782						
<b>37</b>	0,8292	0,8292	0,8571	0,8780					
<b>50</b>	0,5600	0,5800	0,6078	0,5882	0,5777				
<b>67</b>	0,6226	0,6226	0,6481	0,6296	0,5510	0,9500			
<b>74</b>	0,5490	0,5686	0,5961	0,5769	0,5652	0,9736	0,9268		
<b>86</b>	0,6226	0,6226	0,6481	0,6296	0,5510	0,9500	1.0000	0,9268	
<b>105</b>	0,6226	0,6226	0,6481	0,6296	0,5510	0,9500	1.0000	0,9268	1.0000

Araújo et al. (2005) estudando a diversidade genética de isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* com marcadores RAPD observaram uma similaridade mínima de 83% e máxima de 100%, mostrando que os marcadores RAPD não foram tão eficientes para diferenciar os isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Silva-Mann et al. (2002) também utilizaram marcadores de DNA do tipo RAPD para diferenciar isolados do complexo *Colletotrichum* associados ao algodoeiro (*C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*) e os padrões de amplificação indicaram uma similaridade mínima de 35% e máxima de 85%. Apesar de utilizar marcadores moleculares diferentes, resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, uma vez que os marcadores analisados não foram eficientes para diferenciar os isolados pertencentes à mesma espécie, mas foram úteis para análises entre as diferentes espécies.

Nogueira et al. (2012) utilizaram marcadores do tipo IRAP para analisar a variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola* obtendo 18 bandas polimórficas, as quais serviram para estimar a similaridade genética que variou de 0,3 a 1,0, sendo capaz de diferenciar 66,6% da população.

Analisando o dendograma (Figura 2) percebe-se que os isolados foram separados em dois grupos distintos, um grupo incluindo todos os isolados caracterizados como *C. gossypii* e

o outro com agrupamento dos isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Diferente do percebido no nosso estudo, Mehta e Mehta (2010) concluíram que as técnicas RAPD, ERIC- e REP-PCR não foram suficientes para distinguir os isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, sugerindo o estudo de outras técnicas moleculares para tal finalidade. No entanto, nossos resultados mostram que o uso dos marcadores moleculares (ERIC-PCR, ISSR, IRAP, REMAP e Box-PCR), são de grande utilidade para a identificação e diferenciação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, podendo ser utilizados com eficácia para estudos moleculares com tais espécies.



**Figura 2.** Dendrograma revelando a similaridade genética entre dez isolados de *Colletotrichum gossypii* (95, 109, 457-1, 457-2, 37) e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (50, 67, 74, 86, 105), baseado no coeficiente de Jacard, usando o método UPGMA.

#### 4. CONCLUSÃO

A caracterização molecular com os marcadores ERIC-PCR, ISSR, IRAP, REMAP e Box-PCR foram eficientes para estimar a similaridade genética entre os isolados evidenciando significativa semelhança entre estes e permitindo diferenciar *C. gossypii* de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABANG, M. M.; WINTER, S.; MIGNOUNA, H. D.; GREEN, K. R.; ASIEDU, R. Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n.12, p. 486-496, 2003.

ARAÚJO, A. E. de; FUNGARO, M. H.; BARROSO, P. A. V.; SUASSUNA, N. D. Análise da diversidade genética de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *Cephalosporioides* por meio de marcadores RAPD. In: Congresso Brasileiro do Algodão, 5, 2005, Salvador, BA. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. CD ROM

BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. *Colletotrichum*: Biologia, patologia e patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em diferentes espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n.1, p.131-133, 1992.

BARROSO, P. A. V.; HOFFMANN, L. V.; BATISTA, C. E. A.; ARAÚJO, R. L.; MORESCO, E. R. Uso de esferas de inox para maceração de tecidos foliares de algodoeiro destinados à extração de DNA. Embrapa Algodão (**Comunicado técnico: 297**), Campina Grande, 2006.

BORMAN, A. M.; LINTON, C. J.; MILES, S. J.; JOHNSON, E. M. Molecular identification of pathogenic fungi. **Journal Antimicrob Chemother**, v. 61, (Suppl 1), p. i7-i12, 2008.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; OODWIN, P. H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P. R.; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 147-183, 2009.

MEHTA, Y. R.; AVANZI, C. A., CALVGO, E. Molecular characterization of *Colletotrichum gossypii* isolates from cotton. In: Congresso Brasileiro de Algodão, 3., 2001. **Anais...** Embrapa Agropecuaria Oeste: Mato Grosso, p. 32-35, 2001.

MEHTA, Y. R.; MEHTA, A. Variabilidade genética entre isolados de *Colletotrichum gossypii* do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 40-44, 2010.

NOGUEIRA, V. B.; ASSIS, L. A. G.; HANADA, R. E.; SOUSA, N. R.; SILVA, G. F. *Inter-retrotransposon amplified polymorphism* (IRAP) na análise da variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola*, agente causal da antracnose no guaranazeiro. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 45, 2012, Manaus. **Anais...** Manaus: *Tropical Plant Pathology* 38 (Suplemento), 2012.

PHOTITA, W.; TAYLOR, P. W. J.; FORD, R.; HYDE, K. D.; LUMYONG, S. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. **Fungal Diversity**, v. 18, p. 117-133, 2005.

ROHLF, F. J. NTSYS-Pc. Numerical Taxonomy and Multivariable Analysis System, Version 2.1. New York: **New Yorker Exeter Publisher**, 2000.

SANTOS, L. V. dos; QUEIROZ, M. V. de; SANTANA, M. F.; SOARES, M. A.; BARROS, E. G. de; ARAÚJO, E. F. de; LANGIN, T. Development of new molecular markers for the *Colletotrichum* genus using RetroCl1 sequences. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 1087-1095, 2011.

SILVA-MANN, R; SALGADO, K. C. C.; VIEIRA, G. G. C.; MACHADO, J. C. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia brasileira**, v. 27, n. 1, p. 27-32, 2002.

VERSOLOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

ZANOTTA, S. **Estudos morfológicos e moleculares de *olletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides***. Instituto Biológico, 2013. 92p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Biológico, São Paulo, 2013.